

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

**Die Wirkung der Phytosubstanzen Xanthohumol und Resveratrol auf die  
Vaskularisierung von Endometrioseherden**

*Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der theoretischen Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

*2014*

vorgelegt von Jeannette Rudzitis-Auth (geb. Rudzitis)

geb. am 19.06.1972 in Kaiserslautern

***Meinem Vater***

*it must be borne in mind that the tragedy of life doesn't lie in not reaching  
your goal. the tragedy lies in having no goals to reach.  
it isn't a calamity to die with dreams unfulfilled,  
but it is a calamity not to dream.  
not failure, but low aim is sin.  
benjamin e mays*

<b>1.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>8</b>
<b>3.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
<b>3.1.</b>	<b>ENDOMETRIOSE</b>	<b>10</b>
3.1.1.	EPIDEMIOLOGIE UND SYMPTOMATIK	10
3.1.2.	DEFINITION UND STADIENEINTEILUNG	10
3.1.3.	HISTORIE	12
3.1.4.	ÄTIOLOGIE	12
3.1.5.	PATHOGENESE	15
<b>3.2.</b>	<b>THERAPIE DER ENDOMETRIOSE</b>	<b>18</b>
3.2.1.	OPERATIVE THERAPIE	18
3.2.2.	MEDIKAMENTÖSE THERAPIE	18
<b>3.3.</b>	<b>XANTHOHUMOL</b>	<b>20</b>
<b>3.4.</b>	<b>RESVERATROL</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>ZIELSTELLUNG</b>	<b>27</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
<b>5.1.</b>	<b>VERSUCHSTIERE</b>	<b>28</b>
<b>5.2.</b>	<b>MODELL DER INTRAPERITONEALEN ENDOMETRIOSE</b>	<b>28</b>
5.2.1.	BESTIMMUNG DES ZYKLUSSTADIUMS	28
5.2.2.	ENTNAHME VON UTERUSFRAGMENTEN	29
5.2.3.	TRANSPLANTATION VON UTERUSFRAGMENTEN	30
<b>5.3.</b>	<b>SUBSTANZAPPLIKATION</b>	<b>31</b>
5.3.1.	XANTHOHUMOL	31
5.3.2.	RESVERATROL	31
<b>5.4.</b>	<b>VERMESSUNG DER ENDOMETRIOSEHERDE</b>	<b>32</b>
5.4.1.	VOLUMENMESSUNG MITTELS HOCHAUFLÖSENDEM ULTRASCHALL	32
5.4.2.	GRÖßENMESSUNG MITTELS DIGITALEM MESSSCHIEBER	33
5.4.3.	HISTOMORPHOMETRIE	34
<b>5.5.</b>	<b>HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE</b>	<b>34</b>
5.5.1.	HE-FÄRBUNG	34
5.5.2.	PCNA-FÄRBUNG	34
5.5.3.	Ki67-FÄRBUNG	35
5.5.4.	Cleaved CASP-3-FÄRBUNG	35
5.5.5.	CD31-FÄRBUNG	35
5.5.6.	CD31/PCNA-DOPPELFÄRBUNG	35
<b>5.6.</b>	<b>WESTERN BLOT</b>	<b>36</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>5.7.</b>	<b>EXPERIMENTELLES PROTOKOLL</b>	<b>36</b>
5.7.1.	XANTHOHUMOL	37
5.7.2.	RESVERATROL	38
<b>5.8.</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>6.1.</b>	<b>WIRKUNG VON XANTHOHUMOL AUF ENDOMETRIOSEHERDE</b>	<b>40</b>
6.1.1.	DOSIERUNG	40
6.1.2.	WACHSTUM VON ENDOMETRIOSEHERDEN	40
6.1.3.	VASKULARISIERUNG VON ENDOMETRIOSEHERDEN	43
6.1.4.	ZELLPROLIFERATION UND APTOPOSE IN ENDOMETRIOSEHERDEN	45
6.1.5.	KINASEAKTIVITÄT IN ENDOMETRIOSEHERDEN	46
6.1.6.	EINFLUSS VON XANTHOHUMOL AUF DIE WEIBLICHEN GESCHLECHTSORGANE	46
<b>6.2.</b>	<b>WIRKUNG VON RESVERATROL AUF ENDOMETRIOSEHERDE</b>	<b>48</b>
6.2.1.	DOSIERUNG	48
6.2.2.	WACHSTUM VON ENDOMETRIOSEHERDEN	48
6.2.3.	VASKULARISIERUNG VON ENDOMETRIOSEHERDEN	51
6.2.4.	ZELLPROLIFERATION UND APTOPOSE IN ENDOMETRIOSEHERDEN	53
<b>6.3.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>58</b>
<b>7.1.</b>	<b>DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>58</b>
7.1.1.	TIEREXPERIMENTELLE ENDOMETRIOSEMODELLE	58
7.1.2.	ULTRASCHALL-ANALYSE	61
<b>7.2.</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b>	<b>64</b>
7.2.1.	XANTHOHUMOL	64
7.2.2.	RESVERATROL	67
<b>7.3.</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>71</b>
<b>9.</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>93</b>
<b>9.1.</b>	<b>ORIGINALARBEITEN</b>	<b>93</b>
<b>9.2.</b>	<b>KONGRESSBEITRÄGE</b>	<b>93</b>
<b>9.3.</b>	<b>AUSZEICHUNGEN</b>	<b>94</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>95</b>

## 1. Zusammenfassung

### **Die Wirkung der Phytosubstanzen Xanthohumol und Resveratrol auf die Vaskularisierung von Endometrioseherden**

Die Endometriose ist eine weitverbreitete, östrogenabhängige Erkrankung, die etwa 8-10% aller Frauen im reproduktiven Alter betrifft. Histopathologisch ist die Endometriose als das Vorhandensein von funktionalem Endometrium außerhalb der Uterushöhle definiert. Leitsymptome dieser gutartigen, chronisch verlaufenden Erkrankung sind Unterbauchschmerzen, Menstruationsbeschwerden, Dyspareunie und Dysurie. Die Pathomechanismen, die zur Entstehung der Endometriose führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Nach der Theorie von Sampson wird angenommen, dass Endometrium während der Menstruation retrograd durch die Eileiter in den Bauchraum transportiert wird und dort anwächst.

Obwohl die Endometriose als gutartige Erkrankung gilt, weist sie Parallelen zu Tumorerkrankungen auf. So ist neben entzündlichen Prozessen die Angiogenese ein wesentlicher Faktor der zur Entwicklung von Endometrioseherden beiträgt, da die Bildung neuer Blutgefäße das Überleben des Gewebes im Bauchraum sichert. Somit stellt eine anti-angiogene Therapie, wie sie gegenwärtig auch in der Onkologie eingesetzt wird, eine neue Behandlungsstrategie dar. Vorhandene anti-angiogene Medikamente weisen starke Nebenwirkungen auf und können die Vaskularisierung des weiblichen Reproduktionstraktes beeinflussen, sodass gegenwärtig alternative anti-angiogene Konzepte auf Basis der Phytotherapie untersucht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Wirkung der Phytosubstanzen Xanthohumol und Resveratrol auf die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden zu untersuchen. Hierzu wurden isolierte Endometriumfragmente syngene in die Bauchhöhle von BALB/c-Mäusen transplantiert. Die Proliferation des Stromagewebes und die Entwicklung von Zysten wurde anschließend repetitiv mittels hochauflösendem Ultraschall über einen Zeitraum von 28 Tagen analysiert. Nach Beendigung der Versuche wurden die asservierten Gewebeproben histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch weiter aufgearbeitet.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der anti-angiogene Einfluss von Xanthohumol, einem prenylierten Chalkon aus der weiblichen Hopfenpflanze, untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Substanz das Anwachsen und die Entwicklung von Endometrioseherden hemmt. Dies resultierte in einem verminderten Wachstum, ausgelöst durch eine Regression des Stromagewebes, sowie einer verminderten sekretorischen Aktivität der glandulären Zellen. Als möglicher Wirkmechanismus wurde die Inhibition der Phosphoinositid-3-Kinasen identifiziert, welche elementare Bestandteile der Signaltransduktion bei zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration und Adhäsion sind. Des

Weiteren wurde eine eingeschränkte Proliferation der Endothelzellen nachgewiesen und damit verbunden eine verminderte Kapillardichte in den Endometrioseherden, was die anti-angiogene Wirkung von Xanthohumol bestätigt. Diese Wirkung war auf die Herde beschränkt, während die Vaskularisierung der Ovarien und des Uterus nicht beeinträchtigt wurde. Somit stellt Xanthohumol einen vielversprechenden anti-angiogenen Wirkstoff zur Therapie der Endometriose dar.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung des Stilbens Resveratrol auf die Angiogenese von Endometrioseherden untersucht. Es zeigte sich, dass die Vaskularisierung des ektopen Endometriums deutlich durch eine Inhibition der Endothelzellproliferation vermindert wurde. Entsprechend zeigten die Ultraschalluntersuchungen eine signifikante Reduktion der Wachstumsraten der Endometrioseherde. Dies ließ sich auf eine Regression des Stromagewebes zurückführen. Interessanterweise zeigten die Ultraschalluntersuchungen auch, dass die Bildung großvolumiger Zysten in den Resveratrol-behandelten Herden gehemmt wurde. Die histomorphometrische Analyse bestätigte dieses Ergebnis. Diese Resultate sowie die in mehreren klinischen Studien belegte gute Verträglichkeit von Resveratrol lassen daher hoffen, dass Resveratrol als Alternative oder unterstützend zu den herkömmlichen Therapien zur Behandlung der Endometriose eingesetzt werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass Xanthohumol und Resveratrol als anti-angiogen wirkende Pflanzeninhaltsstoffe die Vaskularisierung von Endometrioseherden hemmen. Im Rahmen weiterer Studien sollte untersucht werden, welche intrazellulären Prozesse bei der Entstehung und Entwicklung der Endometriose durch diese Substanzen beeinflusst werden. Dies würde neue Erkenntnisse zur Entwicklung zukünftiger Therapieansätze liefern.

## 2. Summary

### **The effect of the phytochemicals xanthohumol and resveratrol on the vascularization of endometriotic lesions**

Endometriosis is a common estrogen-dependent disease, affecting 8-10% of women during the reproductive age. It is defined as the presence of functional endometrium-like tissue outside the uterine cavity, consisting of endometrial glands and stromal tissue. Main symptoms of this benign, chronic disease are dysmenorrhoea, chronic abdominal or pelvic pain, dyspareunia and dyuria, whereby patients are severely limited in their quality of life. The pathogenesis of endometriosis remains still unclear, but according to the implantation theory of Sampson it is widely accepted that endometrial fragments are retrogradely shed through the fallopian tubes into the peritoneal cavity.

Although endometriosis is a benign disease, it reveals similarities with cancer. Apart from other processes like inflammation, the development of new blood vessels is an essential process to guarantee oxygen and nutrient supply. Since angiogenesis is a prerequisite for the development of endometriotic lesions, the inhibition of vascularization is thought to be a new strategy for the treatment of endometriosis. However, this approach has some limitations. Beside other strong side effects, the physiological vascularization in the female reproductive organs may be affected. Therefore, an increasing number of phytochemical compounds are currently analyzed to provide novel anti-angiogenic treatment strategies for endometriosis.

In the present thesis, the effect of the phytochemical compounds xanthohumol and resveratrol on the vascularization and development of endometriotic lesions was analyzed. For this purpose, intraperitoneal endometriotic lesions were surgically induced by suturing uterine tissue samples from donor mice into the peritoneal cavity of recipient animals. The development of peritoneal lesions was repetitively analyzed by means of high-resolution ultrasound imaging throughout an observation period of 28 days. At the end of the experiments, the lesions were excised for further histological, immunohistochemical and Western Blot analyses.

In the first part of this thesis the anti-angiogenic effect of xanthohumol, a prenylated chalcon from hops, was analyzed. Xanthohumol effectively inhibited the growth and development of endometriotic lesions. This resulted in a reduced lesion size caused by a regression of the stromal tissue and a suppressed secretory function of the glandular cells. Furthermore, as a possible mechanism of action, the inhibition of phosphoinositide 3-kinase expression, an enzyme involved in cellular functions like proliferation, migration and adhesion, was identified. In addition, xanthohumol suppressed the formation of new blood vessels in endometriotic lesions. This was associated with a reduced proliferating activity of the microvascular endothelium. The analysis of uterine horns and



ovaries revealed that xanthohumol did not affect the reproductive organs, possibly due to a selective inhibition of angiogenesis in the ectopic endometrium. Thus, xanthohumol represents a promising anti-angiogenic dietary phytochemical, which may be useful for the treatment of endometriosis.

In the second part of this thesis, the effect of the stilben resveratrol on angiogenesis of endometriotic lesions was analyzed. It was demonstrated that the vascularization of ectopic endometrium was markedly reduced caused by an inhibition of endothelial cell proliferation. Accordingly, the growth of endometriotic lesions was significantly reduced, based on a regression of the stromal tissue. Interestingly, endometrial cysts in resveratrol-treated lesions presented with lower volumes. These results were confirmed by histomorphometric analyses. These findings, as well as the favourable safety and tolerability profiles of resveratrol demonstrated in several clinical studies, indicate that resveratrol may be used as alternative or supportive treatment to common endometriosis therapies.

In summary, it was shown for the first time that xanthohumol and resveratrol exert an anti-angiogenic effect on the vascularization of endometriotic lesions. Further studies have to clarify now which intracellular processes during the establishment and development of endometriosis are affected by these secondary plant ingredients. This will provide new information for the development of future therapeutic strategies.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Endometriose

##### 3.1.1. *Epidemiologie und Symptomatik*

Die Endometriose ist eine benigne gynäkologische Erkrankung und tritt am häufigsten bei Frauen im reproduktiven Alter auf. Dabei liegt die Prävalenz bei ca. 10-15% bei allen Frauen und bei ca. 30% bei infertilen Frauen [CRAMER und MISSMER, 2002; PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2004]. Unklar ist, ob ethnische und soziale Einflüsse hierbei eine Rolle spielen. Während von einem erhöhten Risiko für asiatische Frauen berichtet wird [SANGI-HAGHPEYKAR und POINDEXTER, 1995], konnte MISSMER et al. [2004] eine niedrigere Endometriosehäufigkeit bei afro-amerikanischen Frauen nachweisen. Es besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen hoher Endometrioserate und gehobenem Bildungsstand [HEMMINGS et al., 2004] sowie zwischen niedrigem Body-Mass-Index und einem erhöhten Erkrankungsrisiko [SHAH et al., 2013]. Die tatsächliche Prävalenz der Endometriose ist umstritten. Da viele Frauen keine oder sehr unterschiedliche Symptome zeigen, die eine eindeutige Diagnosestellung erschweren, könnte die Endometriose weiter verbreitet sein als bislang angenommen [RAWSON, 1991].

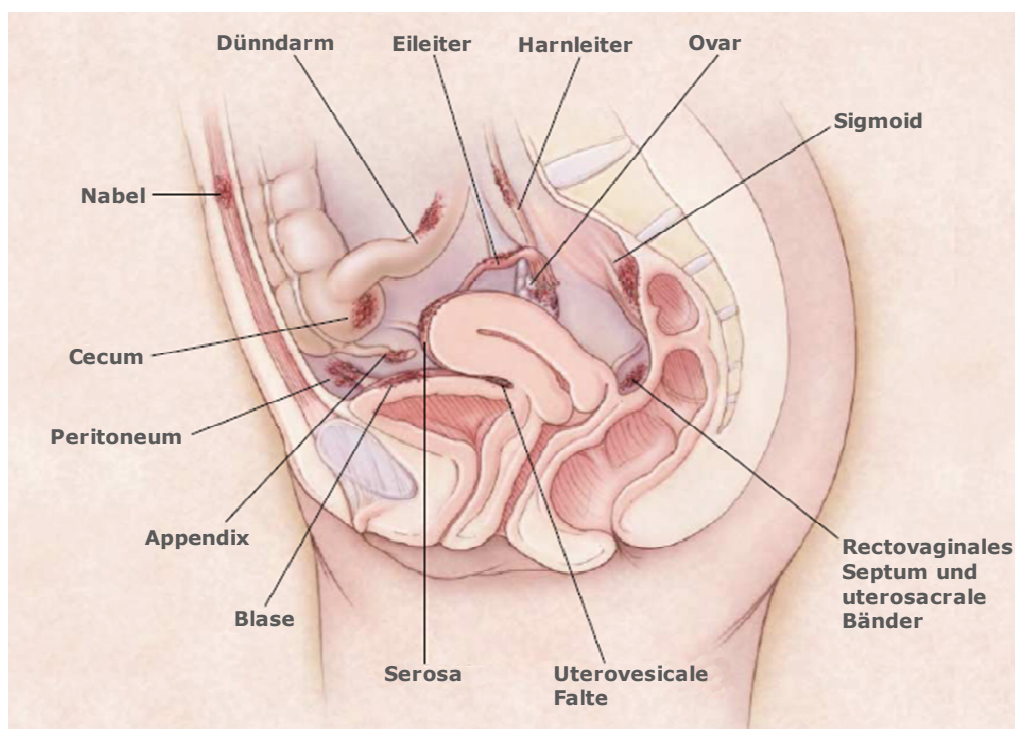
Die Endometriose ist meist mit einer komplexen und variablen Symptomatik verbunden. Ein Leitsymptom ist Schmerz, der in unterschiedlichen Ausprägungen auftritt. Hierzu zählen akute und chronische Unterbauchschmerzen, Dysmenorrhö, Dyspareunie und Dysurie. Neben den allgemeinen körperlichen Beeinträchtigungen hat dies auch Auswirkungen auf das geistige und soziale Wohlbefinden der Patientinnen [KENNEDY et al., 2005]. Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Beschwerden und der Schwere der Erkrankung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELL'ENDOMETRIOSI, 2001].

Die Endometriose hat auch erhebliche volkswirtschaftliche Auswirkungen [GAO et al., 2006]. Schätzungen zufolge beliefen sich die Kosten zur Behandlung Endometriose-assoziiierter Symptome in den USA auf ca. 50 Milliarden Dollar im Jahr 2002 und sind damit vergleichbar mit Ausgaben für Morbus Crohn, Diabetes mellitus oder rheumatoide Arthritis [SIMOENS et al., 2012]. Diese hohen Kosten resultieren unter anderem aus den hohen 5-Jahres-Rezidivraten von bis zu 50% nach operativer und medikamentöser Therapie [GUO et al., 2009].

##### 3.1.2. *Definition und Stadieneinteilung*

Histopathologisch ist die Endometriose durch das Vorhandensein proliferierender, endometrialer Drüsen- und Stromazellen außerhalb der Uterushöhle definiert (*Abb. 1*) [GALLE, 1989]. Sie ist eine östrogenabhängige Erkrankung [BURNEY und GIUDICE, 2012] und befällt am häufigsten das kleine Becken, die Eierstöcke (Ovar) und Eileiter (Tube), den Halteapparat des Uterus und die

Uterusmuskulatur, den Douglas-Raum sowie das Bauchfell (Peritoneum) [REDWINE, 1987; GRUPPO ITALITANO PER LO STUDIO DELL'ENDOMETRIOSI, 1994]. Diesen Lokalisationen zufolge wird die Endometriose in Endometriosis genitalis interna, Endometriosis genitalis externa und Endometriosis extragenitalis unterteilt [EBERT, 2010].

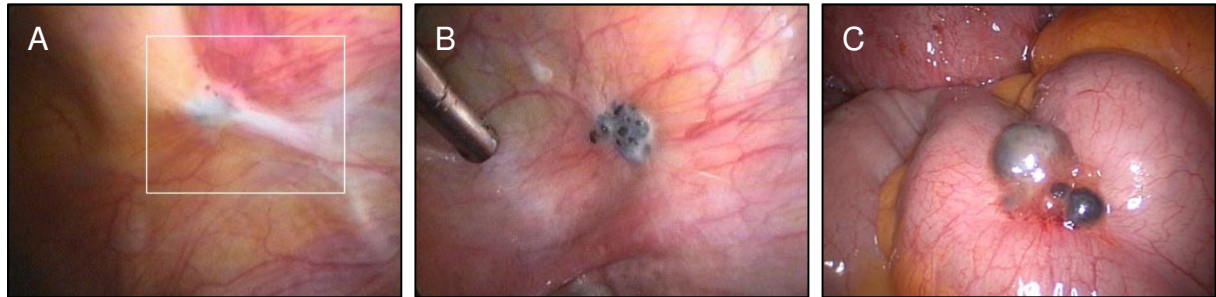


**Abbildung 1:** Häufige Lokalisationen von Endometrioseherden (modifiziert nach OLIVE und PRITTS [2001]).

Generell spricht man von einer Endometriosis genitalis interna, wenn Endometrioseherde innerhalb des Uterus und den Tuben zu finden sind, wobei die Infiltration der Uterusmuskulatur als Adenomyose bezeichnet wird. Endometrioseherde außerhalb des Uterus, auf dem Peritoneum der Tuben, Ovarien und den Uterusbändern werden als Endometriosis genitalis externa bezeichnet (Abb. 2A). Eine Endometriosis extragenitalis resultiert aus der Ansiedlung von Endometrium auf den Organen des Bauchraumes, wobei hier hauptsächlich die Blase, der Darm, das Zwerchfell und die Bauchwand betroffen sind (Abb. 2B-C). Ein Sonderfall stellt die Endometriosis rectovaginale dar, die als Endometriose zwischen den Organen des Bauchraumes definiert ist. Dies führt zu Verwachsungen zwischen der Gebärmutter, der Vagina und dem Enddarm.

In der Praxis werden zur Beurteilung des Krankheitsgrades verschiedene Klassifikationssysteme benutzt. Die Unterteilung der Endometriosis genitalis externa in vier verschiedene Stadien (r-ASRM I-IV) erfolgt nach einem von der American Society for Reproductive Medicine vorgeschlagenen Score. Dabei wird neben der Anzahl, Größe und Lokalisation der Endometrioseherde auch die Infiltrationstiefe sowie die Ausbildung von Adhäsionen beurteilt [THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 1997]. Allerdings werden hierbei rectovaginale Endometrioseherde und

damit auch die tiefinfiltrierende Endometriose nicht berücksichtigt. Für diese Form der Erkrankung wurde die ENZIAN-Klassifikation entwickelt, die als Erweiterung des rASRM-Scores auch den Übertritt auf angrenzende Organe berücksichtigt [ADAMSON, 2011].



**Abbildung 2:** Typisches Erscheinungsbild verschiedener Endometrioseherde. **(A):** Kombination aus weißen und braunen Läsionen unterhalb des rechten Ovars. **(B):** Braune Läsion über der Blase. **(C):** Endometrioseherde am Dünndarm. [A und B entnommen von [www.womenssurgerygroup.com](http://www.womenssurgerygroup.com); C: AL-TALIB und TULANDI, 2010].

### 3.1.3. Historie

Obwohl die Endometriose eine der am häufigsten untersuchten Erkrankungen im Bereich der Gynäkologie ist, sind deren Entstehungsmechanismen bislang noch immer nicht vollständig geklärt. Die älteste bekannte Quelle, in der eine Endometriose als „peritoneale Geschwüre“ auf Blase, Darm und Uterus erwähnt wird, soll bis in das Jahr 1690 zurückgehen. Sie wurde von dem deutschen Mediziner Daniel Shroen in seiner „Disputatio Inauguralis Medica de Ulceribus Uteri“ der Universität Jena veröffentlicht [KNAPP, 1999]. In den letzten Jahren wird jedoch kontrovers diskutiert, ob es sich hierbei tatsächlich um eine Endometriose handelte [BENAGIANO UND BROSENS, 2006] oder die morphologische Erstbeschreibung Carl von Rokitansky zugeschrieben werden muss. Er berichtete 1860 über „Cysten aus drüsenartigen Schlauchbildungen“, die er als „Cystosarcoma (adenoides) uterinum ovarii“ bezeichnete [VON ROKITANSKY, 1860]. Weitere histologische und mikroskopische Untersuchungen erfolgten zeitgleich 1896 von Thomas S. Cullen und Friedrich von Recklinghausen [BENAGIANO und BROSENS, 2006]. Seit dieser Zeit wurden verschiedene Theorien zur Entstehung der Endometriose postuliert, die im folgenden Abschnitt näher dargestellt werden.

### 3.1.4. Ätiologie

#### *Metaplasie-Theorie*

Eine der ersten Theorien zur Entstehung der Endometriose wurde von RUSSEL [1899] und VON RECKLINGHAUSEN [1896] veröffentlicht. Diese beruht auf der Annahme, dass sich Reste von embryonalen Stammzellen in funktionelles Endometrium differenzieren können bzw. mesotheliale Zellen des sekundären Müller’schen Systems metaplasieren [LAUCLAN, 1972]. Weiterhin postulierte IWANOFF [1898] und später auch MEYER [1919] die sogenannte Coelom- bzw. Serosa-Metaplasie-Theorie. Hierbei sollen sich unter Einfluss verschiedener Stimuli aus undifferenzierten Coelom-Zellen

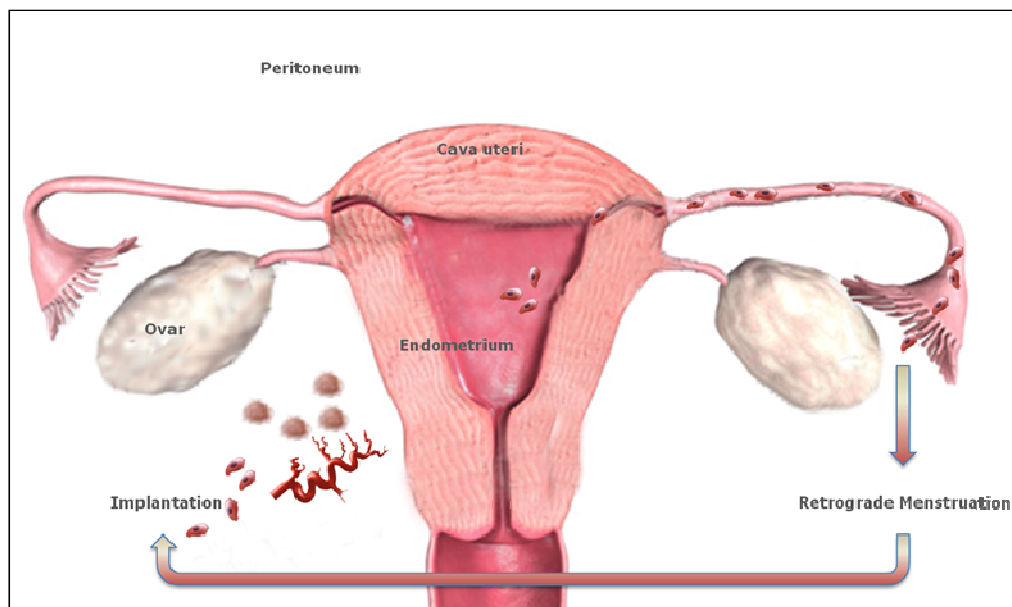
Endometrium-ähnliche Zellen entwickeln. Als Auslöser werden Entzündungsreaktionen [MEYER, 1919], hormonelle Stimulation [NOVAK, 1931] und Induktion [MERRILL, 1966] genannt. Beide Theorien können als Erklärung für das Auftreten von Endometrioseherden bei Männern dienen [OLIKER und HARRIS, 1971; PINKERT et al., 1979; BECKMAN et al., 1985; MARTIN und HAUCK, 1985; GIANNARINI et al., 2006].

#### *Metastasierung*

HALBAN [1924] entwickelte die Theorie der lymphatischen und venösen Metastasierung von Endometrium, was zu einer extraperitonealen Endometriose führen kann. Diese Theorie wird durch Studien gestützt, bei denen Endometrioseherde auf der Pleura, Darm, Leber, Pankreas, Nieren, Harnwegen, Bauchwand sowie im muskuloskelettalen System, Gehirn und zentralen Nervensystem nachgewiesen wurden [HONORÉ, 1999].

#### *Retrograde Menstruation*

Die auch heute noch am weitesten verbreitete Theorie zur Entstehung der Endometriose ist die der retrograden Menstruation von SAMPSON [1927]. Er nahm an, dass einzelne Zellen oder Fragmente des Endometriums während der Menstruation über die Eileiter in den Bauchraum transportiert werden (Abb. 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der retrograden Menstruation nach Sampson (modifiziert nach GIUDICE [2010]).

Verschiedene Fakten sprechen für diese Theorie. Zum einen ist die retrograde Menstruation ein physiologischer Prozess, der bei fast allen Frauen mit funktionsfähigen Eileitern vorkommt. Dies wird durch Untersuchungen bestätigt, die menstruelles Blut bei bis zu 90% der Frauen in der Peritonealflüssigkeit nachweisen konnten [HALME et al., 1984]. Zum anderen entspricht die

Verteilung von Endometrioseherden der Flussrichtung der Peritonealflüssigkeit innerhalb des Bauchraums [JENKINS et al., 1986]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Frauen mit uterinen Fehlbildungen, welche den vaginalen Abfluss des Menstruationssekretes hemmen, ein erhöhtes Endometrioserisiko aufweisen [SANFILIPPO et al., 1986; OLIVE und HENDERSON, 1987].

#### *Kombinationstheorie*

Da keine der bislang aufgestellten Theorien im Einzelnen eine ausreichende Erklärung für die Entstehung einer Endometriose liefert, entwickelte JAVERT [1949] die sogenannte Kombinationstheorie. Diese postuliert die Verbreitung von Endometrium durch invasives Wachstum in das Myometrium, der Ablösung vitaler Zellen aus dem Fimbrientrichter, deren Implantation in das Peritoneum und die angrenzenden Organe sowie der Verschleppung der Zellen über Lymph- und Blutgefäße.

#### *Endometriotic-Disease-Theorie*

Die Endometriotic-Disease-Theorie von KONINCKX et al. [1999] besagt, dass die Entstehung einer Endometriose der Entstehung eines benignen Tumors gleicht und damit auf genetischen Veränderungen von Endometriumzellen beruht. Die mutierten Zellen zeichnen sich durch eine verstärkte Invasivität, ein erhöhtes angiogenes Potential und eine veränderte Reaktion auf Steroidstimuli aus [KONINCKX et al., 1998].

#### *Aromatase-Konzept*

Die Erforschung neuer Therapieansätze lieferte die Basis für das sogenannte Aromatase-Konzept von BULUN et al. [2004]. Er wies eine Überexpression der Aromatase (CYP19A1) in ektopem Endometrium nach. Dieses Enzym wird über Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) induziert und nimmt eine Schlüsselstellung bei der Synthese der Östrogene ein. Östrogene wiederum bewirken die Stimulation des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2). Dies führt zu lokal erhöhten PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen, die über eine positive Rückkopplung eine erneute Stimulation der Aromatase auslösen und damit die proliferativen und entzündlichen Eigenschaften der Endometriose begünstigen. Sowohl in tierexperimentellen Studien als auch in klinischen Studien konnte nach Reduktion der Aromataseaktivität eine Regression von Endometrioseherden beobachtet werden [NOTHNICK, 2011].

#### *Archimetra-Prinzip und TIAR-Konzept*

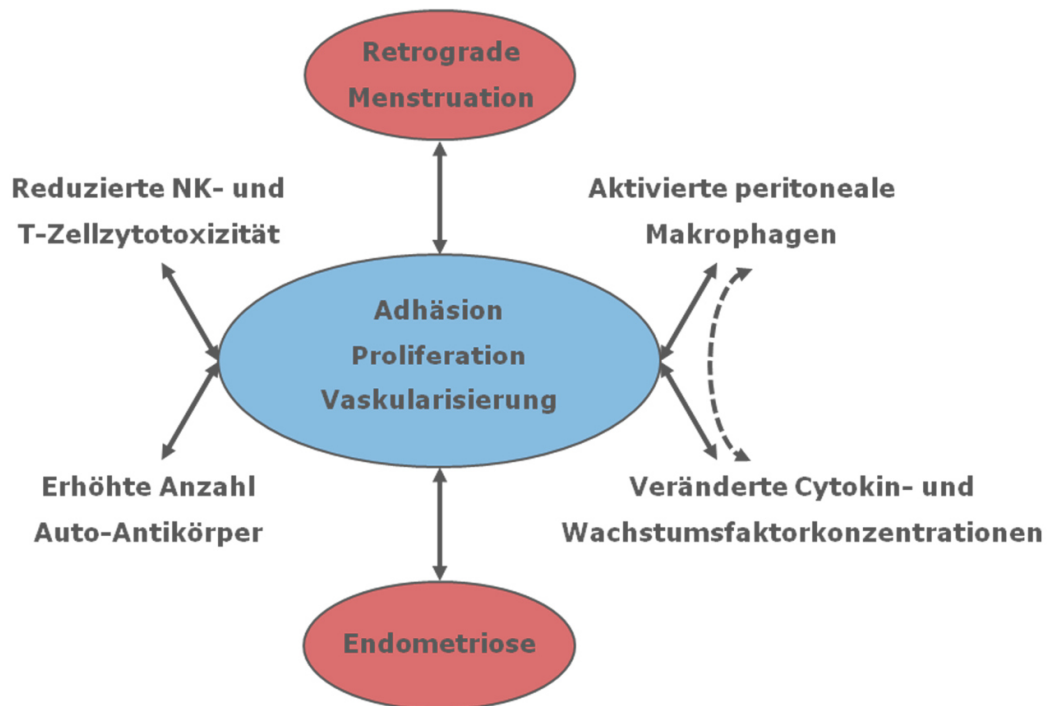
Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der Entstehung der Endometriose ist das von LEYENDECKER [1998] entwickelte „Archimetra-Prinzip“. Er ging davon aus, dass bei Endometriose-Patientinnen eine Funktionsstörung des Endometriums und der darunter liegenden Muskelschicht vorliegt. Die Zellen der endometrialen Basalschicht werden durch eine gesteigerte Peristaltik des Uterus in den Bauchraum transportiert und adhären. Da diese dislozierten Zellen teilweise Stammzell-Charakter

aufweisen, können daraus Drüsen-, Stroma- und Muskelzellen entstehen [LEYENDECKER, 2002]. Später wurde daraus das „Tissue-Injury and Repair-Concept“ (TIAR) abgeleitet. Die durch Endometriose verursachte Hyperperistaltik des Uterus induziert Mikrotraumen an der Grenzschicht zwischen Endometrium und Myometrium, die eine lokale Erhöhung der Östradiolspiegel hervorrufen und die Gewebereparation aktivieren. Die daraus resultierende permanente Hyperperistaltik führt zur Dislokation des basalen Endometriums in die Peritonealhöhle und zur Infiltration des Gewebes in die Uteruswand [LEYENDECKER et al., 2009].

### **3.1.5. Pathogenese**

In den letzten Jahrzehnten konnten verschiedene Mechanismen identifiziert werden, die in der Pathogenese der Endometriose von wesentlicher Bedeutung sind. Hierzu zählen genetische Faktoren. So konnte ein familiärer Zusammenhang zwischen Verwandten ersten Grades und dem Erkrankungsrisiko für Endometriose gezeigt werden [DALSGAARD et al., 2013]. In einer Vielzahl von Studien wurden im Endometrium von erkrankten Frauen verschiedene Genmutationen, die an der Biosynthese von Steroidhormonen sowie an der Regulation des Immunsystems beteiligt sind, identifiziert [MONTGOMERY et al., 2008]. Obwohl ein deutlicher genetischer Einfluss vorliegt, ist die Endometriose keine „Erbkrankheit“ im eigentlichen Sinn, sondern vielmehr ein zufälliges Zusammentreffen verschiedener genetischer Komponenten und molekularer Mechanismen [SIMPSON et al., 2003].

Als weiterer wichtiger pathogener Faktor werden auch Störungen humoraler und zellvermittelter Immunantworten diskutiert (*Abb. 4*). Diese schließen eine erhöhte B-Zellaktivität ein, die in gesteigerten IgG- und IgA-Konzentrationen resultieren [BADAWY et al., 1989]. Weiterhin wurde eine reduzierte T-Lymphozyten- und NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität in Endometriose-Patientinnen nachgewiesen [STEELE et al., 1984; OOSTERLYNCK et al., 1991]. Antikörper, wie sie häufig bei Autoimmunerkrankungen vorkommen, oder solche, die direkt gegen vorhandenes ektopes Endometrium gerichtet sind, treten oft bei den betroffenen Patientinnen in höheren Konzentrationen auf [GLEICHER et al., 1987; FERNÁNDEZ-SHAW et al., 1993;]. Entzündliche Reaktionen bewirken eine Veränderung der Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit. Die Anzahl und der Aktivierungsstatus von Makrophagen ist erhöht und führt somit zu einer Konzentrationsänderung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-6 und -8 (IL-6, -8), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und verschiedenen Wachstumsfaktoren wie z.B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [BERKKANOGLU und ARICI, 2003].



**Abbildung 4:** Immunologische Faktoren bei Endometriose (modifiziert nach BERKKANOGLU und ARICI [2003]).

In Endometriose-Patientinnen wurde in Makrophagen, Endometrioseherden und der Peritonealflüssigkeit ein Überschuss an Eisen nachgewiesen. Eisen wiederum induziert oxidativen Stress durch die Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die ein Ungleichgewicht zwischen Radikalproduktion und antioxidativer Abwehr hervorrufen. Dies führt auch zu entzündlichen Reaktionen, die die Entstehung der Endometriose weiter begünstigen [VON LANGENDONCKT et al., 2002; AUGOULEA et al., 2012].

Neben den genannten Faktoren ist auch die Angiogenese d.h. die Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen, eine wesentliche Voraussetzung für die Ausbildung einer Endometriose. Ähnlich wie bei Tumoren wird das Überleben von Endometrioseherden innerhalb des Bauchraumes durch den Anschluss an das bestehende Blutgefäßsystem sichergestellt. Damit kann eine Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet und deren Adhäsion und Infiltration begünstigt werden [GROOTHUIS et al., 2005]. Dementsprechend stellen sich frühe und besonders aktive Formen der Endometriose im klinischen Bild als rote Läsionen dar, die durch eine hohe Blutgefäßdichte gekennzeichnet sind. Weiße Läsionen hingegen gelten als weniger aktiv [NISOLLE et al., 1993]. Entsprechend zählt man die Endometriose heutzutage ebenso wie Krebs zur Gruppe der angiogenen Erkrankungen [HEALY et al., 1998].

Die Angiogenese ist ein dynamischer Prozess, der durch verschiedene molekulare Mechanismen gesteuert wird [CARMELIET, 2000]. Dabei werden zunächst die Endothelzellen bereits vorhandener Gefäße durch Freisetzung pro-angiogener Faktoren stimuliert. Nach lokaler Auflösung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix proliferieren und migrieren die Endothelzellen in



Richtung des Stimulus und bilden ein neues Gefäßlumen. Die Wand der sich entwickelnden Blutgefäße wird durch rekrutierte Perizyten stabilisiert [FOLKMAN 1984]. Dabei unterliegt die Regulation dieses angiogenen Prozesses einem komplexen System, das auf dem Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren beruht [FOLKMAN, 1995].

In den letzten Jahren wurden verschiedene angiogene Faktoren identifiziert, die an der Pathogenese der Endometriose beteiligt sind. So konnten DONNEZ et al. [1998] nachweisen, dass VEGF während des Menstruationszyklus im Endometrium unterschiedlich exprimiert wird und im Endometrium von Endometriose-Patientinnen erhöht ist. Weiterhin wurde eine erhöhte VEGF-Konzentration in Endometriosegewebe und in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen gefunden [MCLAREN et al., 1996a; MCLAREN et al., 1996b]. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der VEGF-Konzentration [SHIFREN et al., 1996].

Neben VEGF wurden bereits zahlreiche weitere pro-angiogene Faktoren bei Endometriose identifiziert:

- Transforming Growth Factor- beta (TGF- $\beta$ ) [KÜPKER et al., 1998]
- Fibroblast Growth Factor (FGF) [FERRIANI et al., 1993]
- Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) [SURREY und HALME, 1991]
- Hepatocyte Growth Factor (HGF) [Khan et al., 2006]
- Interleukin-1, -6 und -8 (IL-1, -6, -8) [ARICI et al., 1996; FAKIH et al., 1997; KYAMA et al., 2006]
- Tumor Necrosis Factor (TNF) [HARADA et al., 1999]
- Erythropoietin (EPO) [MATSUZAKI et al., 2001]
- Angiogenin [SUZUMORI et al., 2004]
- Angiopoietin 1 und 2 (Ang-1/Ang-2) [DI CARLO et al., 2009]
- Matrixmetalloproteinase 1, 2, 7 und 9 (MMP-1, -2, -7, -9) [DI CARLO et al., 2009; MATSUZAKI et al., 2010]
- Leptin [MALHOTRA et al., 2012]
- Hypoxia Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha) [GOTERI et al., 2009]
- Cyr61 [ABSENGER et al., 2004]

Die Hemmung der Blutgefäßneubildung durch anti-angiogene Substanzen ist somit ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Therapie dieser Erkrankung [HULL et al., 2003].

### **3.2. Therapie der Endometriose**

Da die Ursachen zur Entstehung der Endometriose noch nicht vollständig geklärt sind, gibt es zurzeit keinen kausalen Therapieansatz. Abhängig von der Schwere der Erkrankung, der individuellen Lebenssituation und dem Alter der betroffenen Patientinnen steht die symptomatische Behandlung durch operative Herdsanierung, Hormontherapie sowie Schmerzmedikation im Vordergrund.

#### **3.2.1. Operative Therapie**

Bis heute gilt die Laparoskopie als sicherste Methode zur Diagnose einer Endometriose, die zugleich eine unmittelbare Herdsanierung ermöglicht. Ziel ist hierbei die vollständige Entfernung aller Endometrioseherde. Dabei können Verwachsungen und dadurch verursachte Folgeschäden wie Stenosen mitbehandelt werden [JACOBSON et al., 2009]. Peritoneale, ovarielle und tief-infiltrierende Endometriosen werden hauptsächlich durch laparoskopische Sanierung therapiert, wohingegen bei Patientinnen mit abgeschlossener Familienplanung und Befall des Uterus die Hysterektomie eine effektive Therapie darstellt. Bei infertilen Patientinnen mit Kinderwunsch steht jedoch der Organerhalt im Vordergrund. Da die chirurgische Behandlung meist mit hohen Rezidivraten einhergeht, stellt die Kombination aus operativer und medikamentöser Therapie ein etabliertes Behandlungskonzept dar [FEDELE et al., 1994; GUO, 2009].

#### **3.2.2. Medikamentöse Therapie**

Die Endometriose ist eine Östrogen-abhängige Erkrankung, so dass die gegenwärtige medikamentöse Therapie auf der Hemmung der Östrogen-Produktion beruht. Zum Einsatz kommen hier Gestagene oder Gestagen-Östrogen-Kombinationen wie orale Kontrazeptiva, Gonadotropin-Releasing-Hormon- (GnRH) Agonisten oder Danazol [KENNEDY et al., 2005]. Das Absenken des natürlichen Östrogen-Spiegels bewirkt die Hemmung des Wachstums und der Aktivität der Endometrioseherde, was durch eine Blockade des Regelkreises zwischen Ovar, Hypophyse und Hypothalamus oder der Gonadotropinfreisetzung erreicht wird [NOTHNICK, 2010].

Gestagene blockieren die ovarielle Funktion durch eine reduzierte Freisetzung des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des Luteinisierenden Hormons (LH) und dadurch die Östrogen-induzierte Proliferation des Endometriums. Dies führt zu einer Atrophie vorhandener Endometrioseherde sowie des Endometriums und somit zu einer Senkung des Rezidivrisikos [VERCELLINI et al., 2003M; FEDELE et al., 2001]. Gestagenbetonte Präparate mit einem geringen Anteil an Östrogen sind in ihrer Wirkung effektiver als reine Gestagen-Monopräparate. Der vorhandene Östrogenanteil bewirkt eine gesteigerte Expression der Progesteron-Rezeptoren, sodass die Wirkung der Gestagene erhöht wird. Ein Vorteil dieser Wirkstoffe ist, dass sie über einen längeren Zeitraum in einem kontinuierlichen oder zyklischen Dosierungsschema angewendet werden können.

Eine weitere Therapiemöglichkeit besteht in der Blockierung der GnRH-Rezeptoren, was eine reduzierte LH- und FSH-Freisetzung zur Folge hat. Die dadurch verursachte konstante Senkung des Serum-Östrogen-Spiegels löst typische menopausale Nebenwirkungen wie Hitzewallungen, Migräne oder Osteoporose aus. Daher wird die zusätzliche Gabe von Östrogen empfohlen, um diesen Nebenwirkungen entgegenzuwirken [OLIVE, 2003].

Lange Zeit wurde zur Endometriosetherapie das Testosteronderivat Danazol eingesetzt. Danazol besitzt ein breites Wirkspektrum. Neben der gehemmten Freisetzung von FSH und LH kommt es hierbei zu erhöhten Testosteron-Konzentrationen im Serum [FLOYD, 1980]. Ein weiteres Wirkprinzip liegt in der Inhibition der Zellproliferation durch die kompetitive Bindung von Danazol an Steroidhormonrezeptoren in Endometrioseherden [SURREY UND HALME, 1992]. Aufgrund der ausgeprägten androgenen Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Akne, Veränderungen der Stimmlage und Hirsutismus sollte die Therapiedauer mit Danazol 6 Monate jedoch nicht überschreiten [CROSIGNANI et al., 2006].

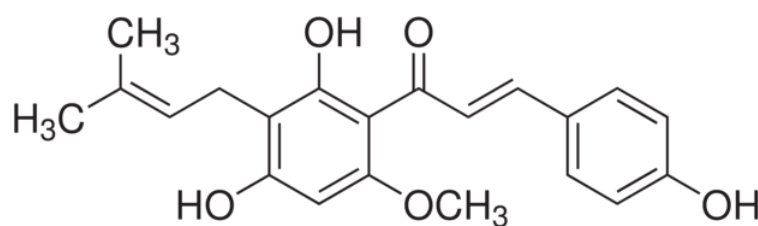
Da die gegenwärtig genutzten Wirkstoffe zur Behandlung der Endometriose auf der Unterdrückung der Östrogenproduktion beruhen und mit entsprechenden Nebenwirkungen einhergehen, werden derzeit alternative Therapieansätze untersucht. Ein neuer Ansatz zur Therapie der Endometriose beruht auf dem Einsatz verschiedener Substanzen mit anti-angiogener Wirkung, denen unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde liegen. Hierzu zählen die Wachstumsfaktoringhibitoren Bevacizumab und SU6668 [LASCHKE et al., 2006a; RICCI et al., 2011], Endostatin [NAP et al., 2004; BECKER et al., 2005], COX-2-Inhibitoren [LASCHKE et al., 2007], 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitoren wie Lovastatin [ESFANDIARI et al., 2007], Simvastatin [BRUNER-TRAN et al., 2009] und Atorvastatin [OKTEM et al., 2007], die Immunmodulatoren Lipoxin A4 [XU et al., 2012], Rapamycin [LASCHKE et al., 2006b] und Pentoxifyllin [VLAHOS et al., 2010], Dopaminagonisten wie Cabergolin und Quinagolid [DELGADO-ROSAS et al., 2011], Inhibitoren der Proteinkinase CK2 [FENG et al., 2012] sowie der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) [OLIVARES et al., 2011].

Obwohl die anti-angiogene Therapie eine vielversprechende Alternative zur Behandlung der Endometriose darstellt, ist die Anwendung dieser Substanzen auf Grund von unerwünschten Nebenwirkungen und fehlender Effektivität limitiert. Da die Gefäßdichte in bereits bestehenden Herden sehr variabel ist, bieten z.B. ältere, weiße Herde mit einer geringen Anzahl an Blutgefäßen auch weniger Angriffspunkte für eine anti-angiogene Therapie. Denkbar wäre jedoch der Einsatz anti-angiogener Substanzen zur Prävention der Endometriose nach erfolgter operativer Sanierung. Ein weiterer entscheidender Nachteil einer anti-angiogenen Behandlungsstrategie sind die Auswirkungen auf den physiologischen Prozess der Angiogenese. Die Bildung neuer Blutgefäße bei

Erwachsenen kommt fast ausschließlich in den weiblichen Reproduktionsorganen vor und wird durch pro- und anti-angiogene Faktoren reguliert [REYNOLDS et al., 1992]. Das Eingreifen in diesen Prozess kann deshalb unter anderem zu Störungen des weiblichen Fortpflanzungssystems führen und damit die Fertilität beeinträchtigen oder möglicherweise sogar teratogen wirken. Aus den genannten Gründen ergibt sich die Notwendigkeit nach komplementären oder adjuvanten Therapieformen. Da viele der heute verwendeten Medikamente von Naturstoffen abgeleitet sind, könnten pflanzliche Inhaltsstoffe eine potentielle Alternative zur Behandlung der Endometriose und ihrer Symptome darstellen [WIESER et al., 2007]. Phytochemische Wirkstoffe werden schon seit langem nebenwirkungsfrei eingesetzt und haben einen hohen Stellenwert in der alternativen Schmerztherapie. In den letzten Jahren wurde für verschiedene pharmakologisch aktive Pflanzeninhaltsstoffe wie Genistein (YAVUZ et al., 2007), Epigallocatechin-3-gallat (LASCHKE et al., 2008; XU et al., 2009), Curcumin (ZHANG et al., 2011), Puerarin (WANG et al., 2011) und 4-Hydroxybenzylalkohol (LASCHKE et al., 2011) unter tierexperimentellen Bedingungen eine therapeutische Wirkung auf Endometrioseherde nachgewiesen. Da Untersuchungen zur anti-angiogenen Wirkung von Xanthohumol und Resveratrol bisher nicht vorliegen, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig der Effekt dieser Substanzen auf die Vaskularisierung und das Größenwachstum von experimentell induzierten Endometrioseherden untersucht.

### 3.3. Xanthohumol

Xanthohumol (Abb. 5) ist ein prenyliertes Chalkon, das erstmals 1913 aus Hopfen (*Humulus lupulus* L.) isoliert wurde [STEVENS et al., 1998].



**Abbildung 5:** Strukturformel von Xanthohumol.

JUNG et al. [2005] identifizierten Xanthohumol als Inhaltsstoff in *Sophora flavescens*, einer Arzneipflanze, die seit langem in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt wird. Xanthohumol akkumuliert jedoch hauptsächlich in den glandulären Trichomen der weiblichen Hopfendolde und stellt mit einem Anteil von 80-90% das wichtigste Prenylflavonoid dar. Bier- und Hopfenzubereitungen gelten als natürliche Nahrungsquelle [STEVENS und PAGE, 2004; STEVENS et al., 1997]. Der Xanthohumolgehalt variiert stark zwischen den verschiedenen Biersorten und liegt bei ca. 0,002-0,69mg/l [STEVENS et al., 1999]. Ungefähr 95% des vorhandenen Xanthohumol gehen

während des Brauprozesses durch Isomerisierung zu Isoxanthohumol und der unzureichenden Extraktion auf Grund des hydrophoben Charakters von Xanthohumol verloren [WUNDERLICH et al., 2005]. Verglichen mit dem Gesamtgehalt an Polyphenolen in Bier ist der Anteil an Prenylflavonoiden vergleichsweise gering [GERHÄUSER, 2005]. Generell ist die Bioverfügbarkeit von Xanthohumol niedrig und nach oraler Gabe können keine relevanten Wirkstoffspiegel im Blutplasma gemessen werden [AVULA et al., 2004]. Als pleiotroper, chemoprotektiver Wirkstoff entfaltet Xanthohumol eine Reihe biologischer Effekte und nimmt Einfluss auf ein breites Spektrum verschiedener zellulärer Mechanismen. Diese haben unter anderem Auswirkungen auf Initiation, Progression und Regression von Tumoren [GERHAUSER et al., 2002].

Verschiedene Effekte werden durch die anti- und pro-oxidative Wirkung von Xanthohumol ausgelöst. ROS, wie das Hydroxyl-, Hyperoxid- oder Peroxyl-Anion, nehmen eine wesentliche Rolle bei oxidativem Stress und damit auch bei vielen pathophysiologischen Vorgängen ein. Ein Überschuss an ROS löst Oxidationsprozesse in Zellstrukturen wie Lipiden, DNA und Proteinen aus und führt zu letalen Zellschädigungen die unter anderem zu Tumorerkrankungen führen [HALLIWELL und CROSS, 1994]. Xanthohumol ist in der Lage, Hydroxyl- und Peroxyl-Radikale abzufangen und die Bildung von Superoxidanion-Radikalen und Stickstoffmonoxid zu inhibieren [GERHAUSER, 2002]. Im Gegensatz zu den anti-oxidativen Eigenschaften wurden in den letzten Jahren Hinweise auf eine pro-oxidative Wirkung von Xanthohumol gefunden. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass die Induktion der Apoptose durch Xanthohumol mit der Freisetzung von ROS gekoppelt ist. Durch Hemmung der Komplexe I-III der mitochondrialen Atmungskette werden vermehrt ROS gebildet. Der daraus resultierende Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und die gleichzeitige Freisetzung von Cytochrom c führt zu einer intrinsischen Apoptose-Induktion [STRATHMANN et al., 2010].

Die extrinsische, rezeptorvermittelte Apoptose wurde in verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen. Xanthohumol aktiviert in Kolonkarzinomzellen die Initiator-Caspase-8 und -9 (Casp-8, -9) und damit die Effektorcaspasen-3 und -7 (Casp-3, -7). Zusätzlich erfolgt die Spaltung der Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), ein weiterer Marker der Apoptose-Induktion [PAN et al., 2005]. Eine vergleichbare Aktivierung der Caspase-Kaskade und der PARP-Spaltung wurde in humanen Prostatakarzinomzellen gefunden. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass die Induktion der Apoptose mit der Inhibition des Transkriptionsfaktors nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) und den dadurch regulierten anti-apoptotischen Proteinen B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) und B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl) assoziiert ist [DEEB et al., 2010].

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist auch für entzündliche und immunologische Prozesse von zentraler Bedeutung [SARKAR et al., 2008]. Die immunmodulatorische Wirkung von Xanthohumol durch NF- $\kappa$ B-Inhibition konnte bereits in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden. Ein antileukämischer Effekt wird

durch die verminderte Expression von NF- $\kappa$ B, Proteinkinase B (AKT) und Focal Adhesion Kinase (FAK) vermittelt [BENELLI et al., 2012]. Weiterhin blockiert Xanthohumol die NF- $\kappa$ B-regulierte Expression des Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) sowie die Chemokin 12 (CXCL12)-induzierte Zellinvasion in Brust- und Darmkrebszellen [WANG et al., 2012]. Des Weiteren steht die Inhibition von NF- $\kappa$ B auch in Zusammenhang mit einer verminderten Zytokinfreisetzung. Die IL-12-Freisetzung durch murine Makrophagen nach Lipopolysaccharid- und Interferon- $\gamma$ -Stimulation wird dadurch ebenso herabgesetzt wie die Freisetzung von IL-6 und IL-1 durch Monozyten sowie bei induzierten Mammakarzinomen und Entzündungsmodellen der Leber [MONTEIRO et al., 2008; CHO et al., 2010; PELUSO et al., 2010; DORN et al., 2013].

Ein weiterer Angriffspunkt für die Regulation von Entzündungen sind Cyclooxygenasen (COX-1 und -2), die Reaktionen der Prostaglandinsynthese katalysieren und deren Aktivität dosisabhängig durch Xanthohumol inhibiert wird [GERHAUSER et al., 2002]. Prostaglandin stimuliert die Bildung von Östrogenen, die das Zellwachstum über die Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren beeinflussen [SACCO et al., 2012].

Xanthohumol hat einen ausgeprägten anti-östrogenen Effekt, ohne eigene östrogene Aktivität zu zeigen. Das anti-östrogene Potential von Xanthohumol wurde in der humanen endometrialen Adenokarzinomzelllinie Ishikawa untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die katalytische Aktivität der Aromatase und somit die Umsetzung von Testosteron zu Östradiol (E2) gehemmt wird [GERHÄUSER, 2005; MONTEIRO et al., 2006]. Darüber hinaus inhibiert Xanthohumol die E2-vermittelte Induktion der alkalischen Phosphatase (ALP) [GERHAUSER et al., 2002]. Dies wurde von GUERREIRO et al. [2007] bestätigt, die eine Inhibition der ALP und damit assoziiert eine Reduktion der Zellproliferation durch E2 und Xanthohumol in Brustkrebszellen nachweisen konnten.

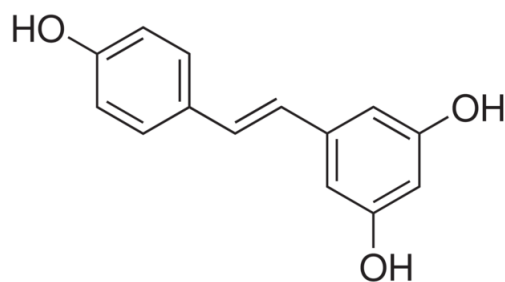
Die Hemmung der Zellproliferation durch Xanthohumol wurde in verschiedenen Tumorzelllinien aus Brust, Darm, Ovar, Fibrosarkom, Kaposi-Sarkom, Prostata, Leukämie, Leber und Schilddrüse untersucht [MIRANDA et al., 1999; GOTO et al., 2005; ALBINI et al., 2006; DELMULLE et al., 2006; DELL'EVA et al., 2007; COOK et al., 2010; DORN et al., 2010]. Die anti-proliferative Wirkung wird durch verschiedene Effekte vermittelt. MIRANDA et al. [1999] konnten eine Inhibition der DNA-Synthese in humanen Brustkrebszellen nachweisen. Dieser Mechanismus sowie ein Arrest in verschiedenen Zyklusphasen wurde auch für humane Kolon- und Prostatakarzinomzellen angenommen [PAN et al., 2005; VENÈ et al., 2012].

Xanthohumol wirkt als effektiver Inhibitor der Proteinkinase B. Diese greift in die Regulation der Zellproliferation über eine Induktion der Apoptose ein [DEEB et al., 2010] und moduliert die Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen wie Cyclin D1 und p21 [MONTEGHIRFO et al., 2008; HARIKUMAR et al., 2009;]. Die Überexpression der Tyrosinkinase FAK wurde ebenfalls mit einem

gesteigerten Zellwachstum bei verschiedenen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der FAK-Aktivität und einer gesteigerten VEGF-Konzentration aufgestellt werden. Als ein wichtiger pro-angiogener Faktor ist VEGF an der Bildung neuer Blutgefäße in Endometrioseherden beteiligt. *In vitro* wurde in CML (chronische myeloische Leukämie) Zelllinien [DELL'EVA et al., 2007] sowie in humanen Prostatakarzinomzellen eine Verminderung der Sekretion von VEGF nachgewiesen [VENÈ et al., 2012]. Die Behandlung humaner Endothelzellen mit Xanthohumol inhibiert die Reorganisation der Zellen und dadurch die Bildung gefäßähnlicher Strukturen in einem 3D-Matrigel-Assay. Zusätzlich konnte *in vivo* in induzierten Kaposi-Sarkomen eine Reduktion der Blutgefäßdichte und damit ein verringertes Größenwachstum nachgewiesen werden [ALBINI et al., 2006]. Diese anti-angiogene Wirkung von Xanthohumol wurde auch in humanen Brustkrebs-Xenotransplantaten in Mäusen gezeigt [MONTEIRO et al., 2008].

### 3.4. Resveratrol

Resveratrol (Abb. 6) ist ein Polyphenol, das hauptsächlich in Weintrauben, Nüssen und verschiedenen Beeren sowie im japanischen Staudenknöterich vorkommt. Die am weitesten verbreitete Nahrungsmittelquelle für Resveratrol stellt Rotwein mit Konzentrationen des *trans*-Isomeres von 0,1-15mg/l dar [CARERI et al., 2004]. Als natürliches Phytoalexin wird die Substanz in Pflanzen zur Abwehr von viralen und mikrobiellen Infektionen, bei UV-Schädigungen und Verletzungen gebildet [BAUR und SINCLAIR, 2006].



**Abbildung 6:** Strukturformel von Resveratrol.

Resveratrol steht in Zusammenhang mit dem Begriff des „french paradox“, bei dem kardiovaskuläre Erkrankungen in Frankreich trotz ungesunder und fettreicher Ernährung seltener auftreten [RENAUD und DE LORGERIL, 1993]. Als Ursache hierfür wird der Konsum von Rotwein und damit von Resveratrol angesehen. Wie bei vielen anderen Pflanzeninhaltsstoffen ist die orale Bioverfügbarkeit von Resveratrol mit weniger als 1% sehr gering [WALLE, 2011]. Ähnlich wie Xanthohumol ist Resveratrol ebenfalls ein pleiotroper Wirkstoff, dem verschiedene positive Effekte zugeschrieben werden und der seit langem in der traditionellen chinesischen und japanischen Medizin eingesetzt

wird. Noch heute wird eine aus Weintrauben hergestellte ayurvedische Zubereitung zur Heilung verschiedener Erkrankungen eingesetzt [AGGARWAL et al., 2004].

Neben anti-inflammatorischen Eigenschaften sowie einer präventiven Wirkung gegen Alterung, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen sowie Diabetes beeinflusst Resveratrol auch das Wachstum verschiedener Krebsarten [BAUR und SINCLAIR, 2006]. Ersten tierexperimentellen Untersuchungen zufolge wirkt Resveratrol chemopräventiv und inhibiert die Karzinogenese [JANG et al., 1997]. In *in vitro* und *in vivo* Studien wurde eine Vielzahl verschiedener intrazellulärer Targets identifiziert, die das Zellwachstum, entzündliche und apoptotische Prozesse sowie die Angiogenese beeinflussen [ATHAR et al., 2009]. Die chemische Struktur von Resveratrol ähnelt dem synthetischen Östrogen Diethylstilbestrol. Die Substanz bindet mit geringer Affinität an Östrogenrezeptoren (ER) und verstärkt abhängig vom Zelltyp die Aktivierung der Hormonrezeptor-vermittelten Gentranskription. Resveratrol wirkt dosisabhängig in ER-positiven Geweben entweder als Agonist oder Antagonist und moduliert auch in ER-negativen Geweben verschiedene Signalwege [SIGNORELLI und GHIDONI, 2005].

Als Antioxidanz ist Resveratrol in der Lage ROS abzufangen und die Aktivität ROS-produzierender Enzyme zu verringern. Gleichzeitig wird die Aktivität ROS-metabolisierender Enzyme erhöht und dadurch ausgelöste oxidative DNA-Schäden verhindert. Dies beeinflusst biologische Prozesse wie die Regulation des Zellzyklus und die Biogenese von Mitochondrien [CARRIZZO et al., 2013]. Jedoch weist Resveratrol abhängig von der Konzentration und des analysierten Zelltyps auch pro-oxidative Eigenschaften auf. Diese führen in Verbindung mit Metallen wie Kupfer zu oxidativen DNA-Strangbrüchen, sodass man davon ausgeht, dass dies ein weiterer Mechanismus ist, über den pflanzliche Polyphenole ihre chemopräventiven Eigenschaften entfalten [DE LA LASTRA und VILLEGAS, 2007].

In klinischen Studien wurde an gesunden Probanden nachgewiesen, dass Resveratrol neben der Regulation von ROS auch verschiedene Entzündungsmarker wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und NF- $\kappa$ B beeinflusst [GHANIM et al., 2010]. Die Hemmung von Entzündungsreaktionen über die Inhibition verschiedener proinflammatorischer Mediatoren stellt somit einen weiteren möglichen protektiven Mechanismus dar. Resveratrol wurde in verschiedenen Studien als potenter COX-Inhibitor beschrieben, der die Freisetzung von proinflammatorischen Prostaglandinen in Tumorgewebe und bei induzierter Kolitis inhibiert [LI et al., 2002; SÁNCHEZ-FIDALGO et al., 2010;].

Als proinflammatorischer Transkriptionsfaktor ist NF- $\kappa$ B ein wesentliches Element bei der Regulation wichtiger Signalwege, die an der Kontrolle von Zellproliferation, Differenzierung, Signaltransduktion und Apoptose beteiligt sind. Resveratrol inhibiert *in vitro* die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Hemmung der I $\kappa$ B-Kinase [HOLMES-MCNARY und BALDWIN, 2000]. In tierexperimentellen Studien bewirkt dies



eine Reduktion der Tumorgroße und eine höhere Überlebensrate bei Hautkrebs [CHEN et al., 2012], hepatozellulärem Karzinom [YU et al., 2010], Mammakarzinom [BANERJEE et al., 2002], malignen Lymphomen [SINGH et al., 2011] und Pankreaskarzinom [HARIKUMAR et al., 2010].

Die Reduktion des Tumorwachstums wird mit der pro-apoptotischen Wirkung von Resveratrol sowohl über die Aktivierung des intrinsischen (mitochondrial) als auch des extrinsischen (rezeptorvermittelt) Weges in Verbindung gebracht [SINGH et al., 2011]. Dabei wird eine Destabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials durch die Hemmung der Bcl-2 Protein- und Genexpression, die daraus resultierende Cytochrom c Freisetzung sowie die Aktivierung von Casp-3, -8 und -9 bewirkt. Des Weiteren wird p53, ein Tumorsuppressor, durch Resveratrol aktiviert und trägt ebenfalls zur Apoptose-Induktion und zum Zell-Zyklus-Arrest bei [DELMAS et al., 2006].

Die Regulation des Zellzyklus und damit die Proliferationsfähigkeit der Zellen unterliegt einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen und Enzymkomplexen wie Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk), die an unterschiedlichen Kontrollpunkten während des Zyklus aktiviert werden [ATHAR et al., 2009]. Resveratrol blockiert den Übergang von der G1- zur S-Phase durch eine verminderte Expression der Cycline D1, D2 und E sowie cdk2, 4, und 6 in verschiedenen Tumorzelllinien [AHMAD et al., 2001]. Weiterhin konnte eine Akkumulation von humanen Krebszellen in der S-Phase beobachtet werden. Dies wurde vor allem durch die Inhibition von Cyclin B1 ausgelöst [JOE et al., 2002]. Ein zusätzlicher Mechanismus des S-Phasen-Arrest besteht in der Interaktion von Resveratrol mit der DNA-Polymerase und der damit verbundenen Inhibition der DNA-Synthese [ESTROV et al., 2003]. Im weiteren Verlauf des Zellzyklus verhindert Resveratrol die Transition der G2- zur M-Phase über die Akkumulation der Cycline A und B sowie durch die cdk7-vermittelte Reduktion der cdk1-Aktivität [LIANG et al., 2003].

Die pro-apoptotische und proliferationshemmende Wirkung von Resveratrol auf die Endometriose wurde in einer tierexperimentellen Studie bereits beschrieben und resultiert in einer verminderten Anwachsrate sowie einem reduzierten Gesamtvolumen von Endometrioseherden. Des Weiteren wurde ein dosisabhängiges, herabgesetztes Invasionspotential humaner endometrialer Stromazellen unter dem Einfluss von Resveratrol nachgewiesen [BRUNER-TRAN et al., 2011]. Ob die Regression Resveratrol-behandelter Endometrioseherde mit einer Hemmung der Angiogenese assoziiert ist, wurde bisher jedoch nicht untersucht.

In verschiedenen Tumorstudien konnte die Neubildung von Blutgefäßen durch Resveratrol inhibiert werden. Dabei wird das endotheliale Zellwachstum durch die Blockierung der VEGF- und FGF-Rezeptor-vermittelten angiogenen Reaktion und der Inhibition der Phosphorylierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gestört [BRÅKENHJELM et al., 2001]. Andere mögliche molekulare Mechanismen der Angiogenesehemmung ist die Hemmung der Aktivität von NF-kB [YU et al., 2010]

und MMP-9 sowie die reduzierte Expression von Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) und COX-2 [HARIKUMAR et al., 2010]. Weiterhin inhibiert Resveratrol die durch Hypoxie vermittelte Aktivierung der Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK1/2) und AKT. Dies führt zu einer verminderten HIF-1alpha-Expression und einer damit verbundenen, geringeren VEGF-Freisetzung [ZHANG et al., 2005].

Die durch Tumor-Studien belegten Effekte auf eine Vielzahl angiogener Mechanismen lassen deshalb erwarten, dass Resveratrol auch auf die Endometriose eine anti-angiogene Wirkung ausüben könnte, was in der vorliegenden Arbeit näher analysiert wurde.

#### 4. Zielstellung

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Xanthohumol und Resveratrol auf die Entwicklung experimentell induzierter Endometrioseherde im Mausmodell zu untersuchen. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann Xanthohumol oder Resveratrol das Größenwachstum und die Zystenbildung der Endometrioseherde hemmen?
2. Inhibieren die Substanzen die Entwicklung neuer Blutgefäße in induzierten Endometrioseherden?
3. Wird die zelluläre Proliferationsfähigkeit der Endometrioseherde durch die Behandlung mit Xanthohumol oder Resveratrol reduziert?
4. Ist die anti-angiogene Wirkung der Substanzen abhängig von der Endothelzellproliferation?
5. Hemmt Xanthohumol die Expression von pERK1/2 oder PI3-K?

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Versuchstiere

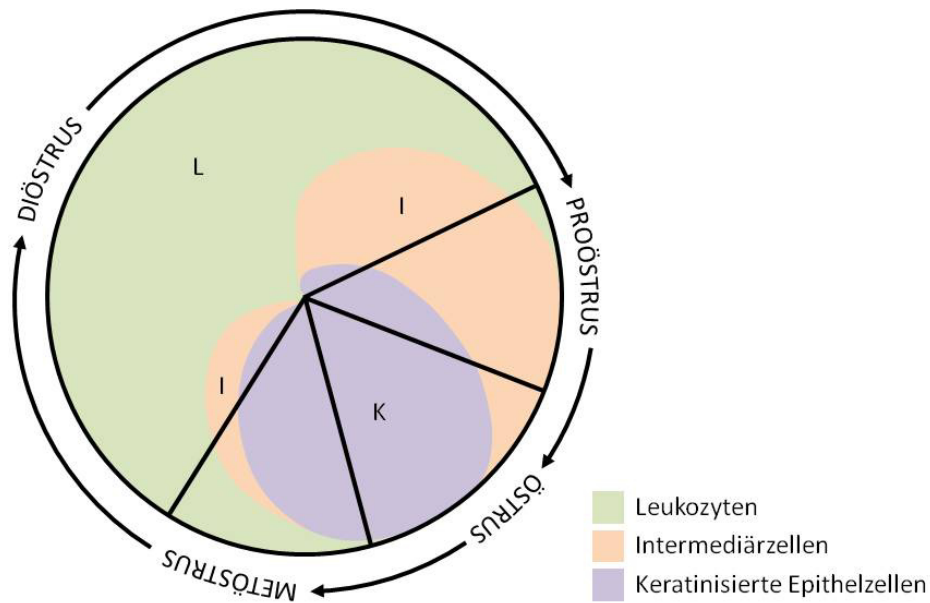
In der vorliegenden Arbeit wurden als Versuchstiere weibliche BALB/c-Mäuse (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Das Körpergewicht der 10-14 Wochen alten Tiere betrug 18-22g und wurde wöchentlich kontrolliert. Die Haltung erfolgte in Gruppen von mehreren Tieren unter klimatisierten Bedingungen mit einem 12h/12h-Tag/Nachtrhythmus. Trinkwasser und Standardpelletfutter (Altromin, Lage, Deutschland) waren jederzeit frei zugänglich. Das Schlaf- und Fressverhalten sowie der Allgemeinzustand der Tiere wurde während der Experimente kontinuierlich überwacht. Die gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Saarbrücken) genehmigten Versuche wurden alle am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar) durchgeführt.

### 5.2. Modell der intraperitonealen Endometriose

#### 5.2.1. Bestimmung des Zyklusstadiums

In die Versuche wurden nur Mäuse als Spender und Empfänger einbezogen, die sich zum Zeitpunkt der Entnahme und Transplantation von Uterusfragmenten im Stadium des Östrus befanden, um den Einfluss hormoneller Schwankungen auf die Experimente auszuschließen. Das Zyklusstadium wurde mittels Vaginalabstrich bestimmt. Hierzu wurden 15 µl 0,9%-ige Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Vagina der Tiere pipettiert und mit den darin befindlichen Zellen gemischt. Die Zellsuspension wurde anschließend auf einen Objektträger aufgebracht und das Zyklusstadium mikroskopisch (CH-2; Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert.

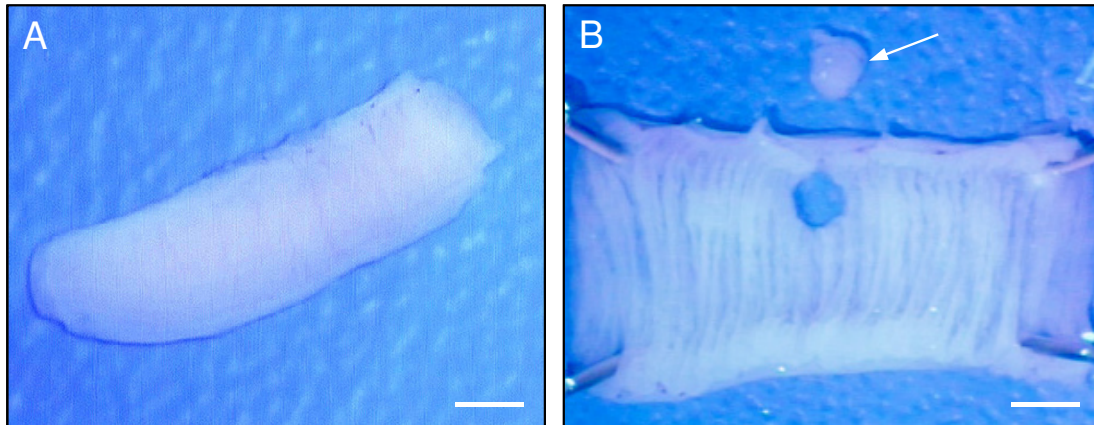
Der Zyklus der Maus untergliedert sich in die vier Zyklusstadien Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus [BYERS et al., 2012]. Diese Stadien können leicht durch die visuelle Charakterisierung der vorhandenen Zelltypen identifiziert werden (*Abb. 7*). Während des Proöstrus sind hauptsächlich Parabasalzellen und Intermediärzellen vorhanden. Zu Beginn des Proöstrus können noch vereinzelt Leukozyten vorliegen, wohingegen während des späten Proöstrus auch Superficialzellen zu finden sind. Der Vaginalabstrich während des Östrus weist überwiegend kernlose, keratinisierte Epithelzellen auf. Das Stadium des Metöstrus ist durch ein gemischtes Zellbild charakterisiert, in dem Leukozyten, keratinisierte Epithelzellen und vereinzelte Intermediärzellen auftreten. Der Übertritt in das Stadium des Diöstrus ist durch das ausschließliche Vorkommen von Leukozyten gekennzeichnet.



**Abbildung 7:** Verteilung der verschiedenen Zellfraktionen während des Zyklus der Maus nach BYERS et al. [2012].

### 5.2.2. Entnahme von Uterusfragmenten

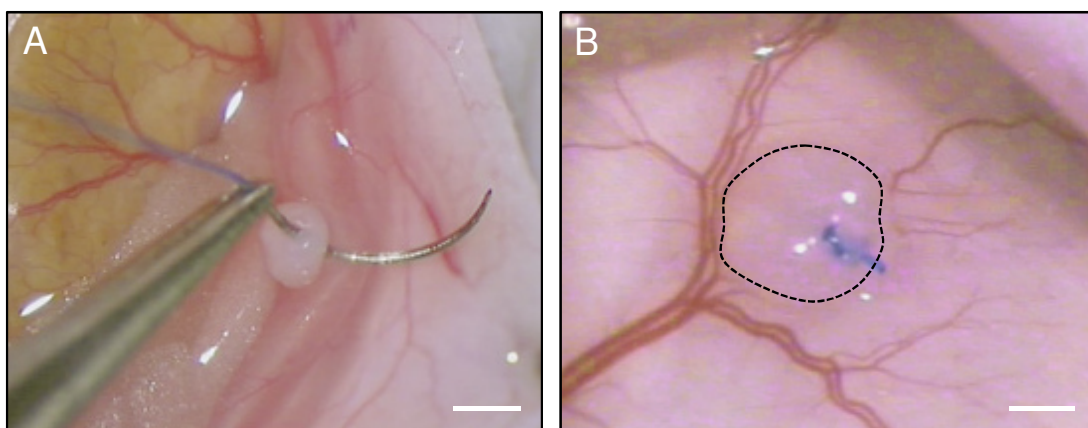
Die Induktion intraperitonealer Endometrioseherde erfolgte durch syngene Transplantation von Uterusfragmenten aus Spendermäusen in die Bauchhöhle von Empfängertieren. Zur Gewinnung der Transplantate wurden die Tiere mit Ketamin (75 mg/kg; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer, Leverkusen, Deutschland) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Nach Desinfektion des Bauches mittels 70% Alkohol erfolgte eine mediane Laparotomie und Auslagerung des Darms. Anschließend wurden beide Uterushörner exzidiert und in eine Petrischale mit 37°C warmen Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM; 10% fetales Kälberserum, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) transferiert (Abb. 8A). Die Uterushörner wurden mit einer Mikroschere unter einem Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) längs eröffnet. Mit Hilfe einer 2 mm-Biopsiastanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) wurden dann Uterusfragmente gewonnen (Abb. 8B), welche in die Bauchhöhle der Empfängermäuse transplantiert werden konnten.



**Abbildung 8:** Entnahme der Uterusfragmente. **A:** Exzidiertes Uterushorn in DMEM-Medium. **B:** Längs eröffnetes, aufgespanntes Uterushorn mit 2 mm großem ausgestanzten Uterusfragment (Pfeil). Maßstab: 2,5 mm (A-B).

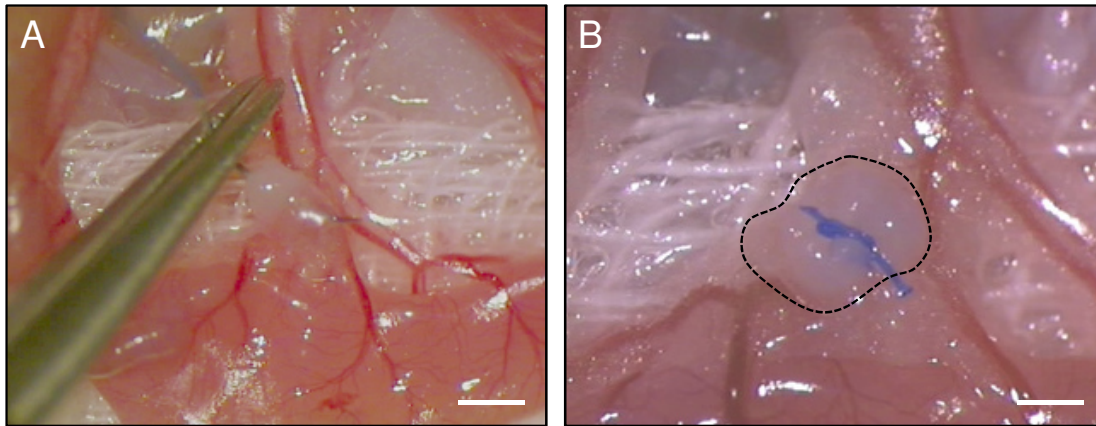
### 5.2.3. Transplantation der Uterusfragmente

Zur Transplantation der Uterusfragmente wurden die Empfängertiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun; Bayer) narkotisiert und das Fell der Bauchdecke mit Enthaarungscreme (Nair hair removal lotion; Church & Dwight Canada Corp., Mississauga, ON, Kanada) entfernt. Nach medianer Laparotomie entlang der Linea alba wurde auf jeder Seite ein Uterusfragment mit einem 6-0 Prolene-Faden (Ethicon Produkte, Norderstedt, Deutschland) am Peritoneum der Bauchwand fixiert (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Induktion intraperitonealer Endometrioseherde im Mausmodell. **A:** Annähen eines Uterusfragments an die Bauchwand eines Empfängertieres. **B:** Typisches Erscheinungsbild des angenäherten Gewebes (schwarze Linie) nach Fixierung am Peritoneum. Maßstab: 2,5 mm (A), 1,25 mm (B).

Nach vorsichtiger Auslagerung des Darms konnten zwei weitere Uterusfragmente durch 6-0 Prolene-Naht (Ethicon Produkte) an das Mesenterium des Dünndarms angenäht werden (Abb. 10). Abschließend wurde die Muskulatur mit einer fortlaufenden 6-0 Prolene-Naht (Ethicon Produkte) und die Haut mit einer fortlaufenden 5-0 Prolene-Naht (Ethicon Produkte) verschlossen.



**Abbildung 10:** Induktion mesenterialer Endometrioseherde im Mausmodell. **A:** Annähen eines Uterusfragments an das Mesenterium eines Empfängertieres. **B:** Typisches Erscheinungsbild des angenähten Gewebes (schwarze Linie) nach Fixierung am Mesenterium. Maßstab: 2,5 mm (**A**), 1,25 mm (**B**).

### 5.3. Substanzapplikation

#### 5.3.1. Xanthohumol

Um den Einfluss von Xanthohumol auf das Größenwachstum von Endometrioseherden zu untersuchen, wurden jeweils 8 Tiere mit 100  $\mu$ M Xanthohumol-Lösung (Hopsteiner, Mainburg, Deutschland) oder 0,1% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) als Vehikel-Kontrolle *ad libitum* über das Trinkwasser behandelt. Die Substanzgabe begann 3 Tage vor Induktion der Endometrioseherde bis zum Ende des Versuches nach 28 Tagen. Um eine Zersetzung des Wirkstoffes zu vermeiden, wurde die Lösung jeden Tag erneuert und in lichtundurchlässigen Flaschen bereitgestellt. Die aufgenommene Menge an Xanthohumol pro Tier entspricht einer Dosis von ca. 8 mg/kg täglich. Diese Dosierung zeigte bereits in einer früheren Studie einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Brustkrebs im Mausmodell [MONTEIRO et al., 2008]. Dabei führte die Behandlung mit Xanthohumol zu einer reduzierten Tumorgroße durch eine verminderte Proliferationsrate und erhöhte Apoptoserate der Brustkrebszellen. Zusätzlich konnte eine verminderte Gefäßdichte innerhalb der behandelten Tumore nachgewiesen werden.

#### 5.3.2. Resveratrol

Die Wirkung von Resveratrol auf die Angiogenese in Endometrioseherden wurde in einem zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit untersucht. Beginnend am Tag der Induktion der Endometrioseherde wurden die Tiere einmal täglich über einen Zeitraum von 28 Tagen mit 40 mg/kg Resveratrol (gelöst in 100  $\mu$ l 25% Ethanol; Biomol, Hamburg, Deutschland) oder 100  $\mu$ l 25% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG) intragastral behandelt. Diese Dosierung führte in anderen Studien zu einer Inhibition des Gefäßwachstums in Tumoren [TSENG et al., 2004; HARIKUMAR et al., 2010]. Die Applikation erfolgte nach einer Kurzzeinnarkose mit 5 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim,

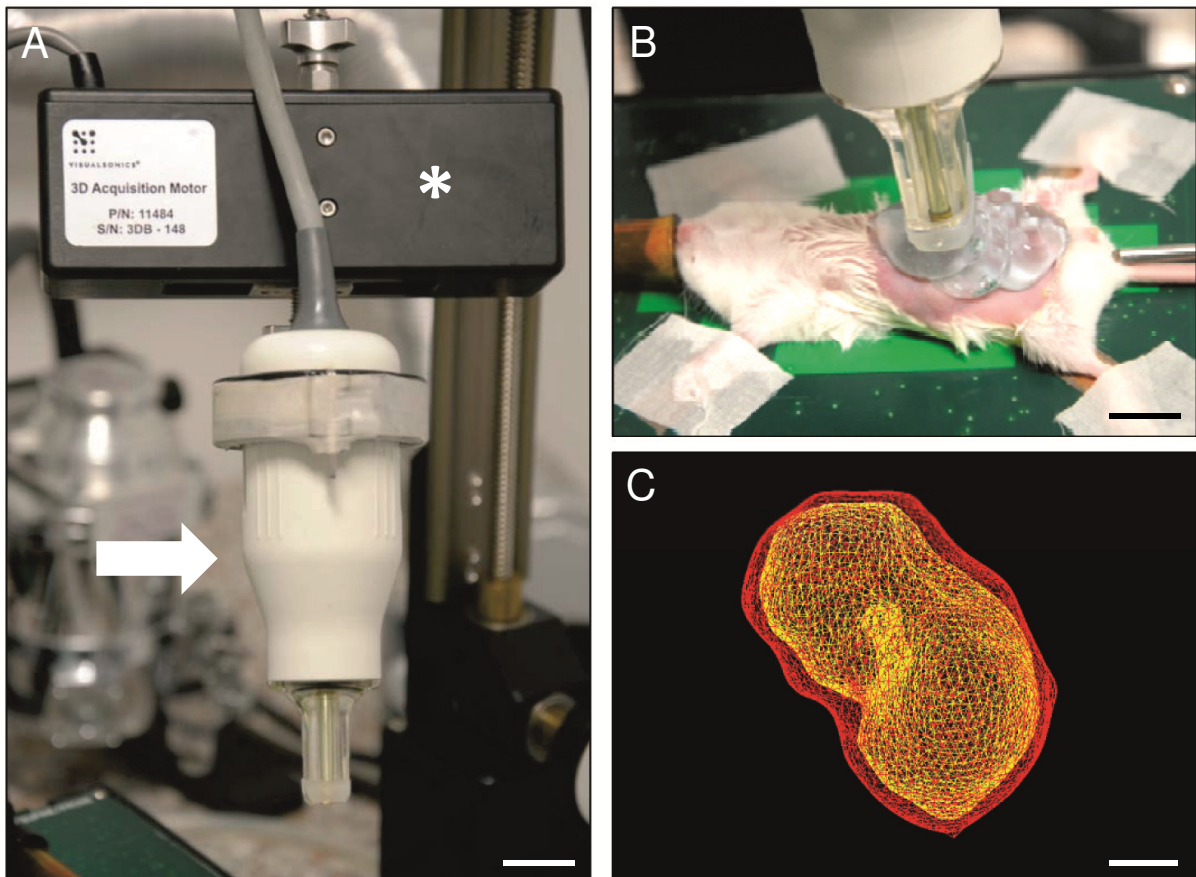


Deutschland) mit Hilfe einer Knopfkanüle (gerade; 1,2x60 mm; Henry Schein Vet GmbH, Hamburg, Deutschland).

#### 5.4. Vermessung der Endometrioseherde

##### 5.4.1. Volumenmessung mittels hochauflösendem Ultraschall

Zur Volumenmessung der induzierten Endometrioseherde wurden in beiden Studienabschnitten Ultraschall-Analysen (Vevo770, VisualSonics, Toronto, Kanada) der Transplantate an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 durchgeführt. Zur Generierung zweidimensionaler Schnittbilder wurde ein 704RMV (VisualSonics)-Schallkopf mit einer Frequenz von 40 MHz und einer Fokustiefe von 6 mm verwendet. Die Bilder wurden mit Hilfe eines linearen Motors im Abstand von 50 µm aufgenommen (*Abb. 11A und B*). Anschließend wurden daraus dreidimensionale Bilder der Herde mit einer speziellen Software (Vevo770 V2.3.0, VisualSonics) rekonstruiert (*Abb. 11C*) und zur Volumenmessung verwendet.



**Abbildung 11:** Sonographische Aufnahme von Endometrioseherden in der Maus. **A:** 40 MHz Ultraschallkopf (Pfeil) mit linearem Motor (Stern). **B:** Abdominale Ultraschalluntersuchung der Maus. **C:** Dreidimensionale Rekonstruktion eines Endometrioseherdes (rot = Gesamtvolumen; gelb = Zystenvolumen). Maßstab: 20 mm (A), 13 mm (B), 0,7 mm (C).

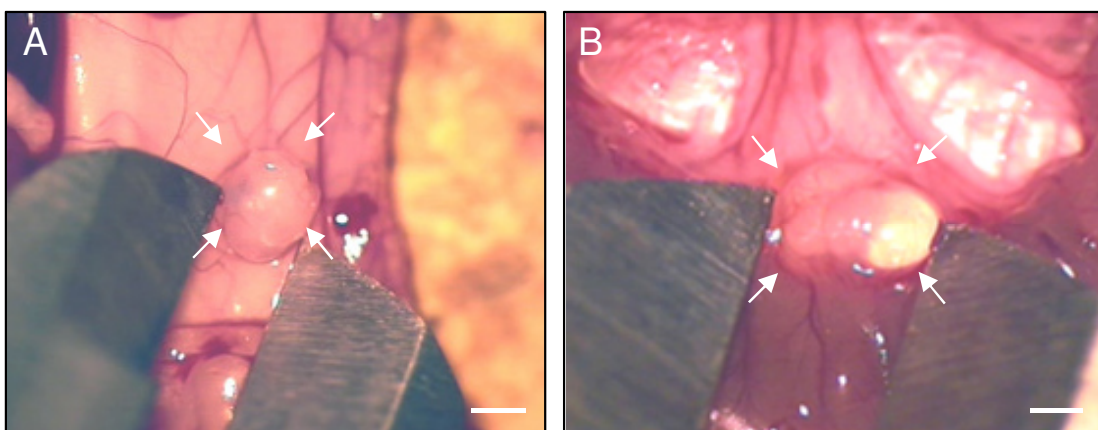
Für die hochauflösende Ultraschall-Analyse wurden die Tiere mit 5 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH) in 100% Sauerstoff narkotisiert und in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch fixiert. Über eine Atemmaske erfolgte die Aufrechterhaltung der Narkose mit 2 Vol-% Isofluran



(Baxter Deutschland GmbH). Mit Hilfe einer Elektrode (THM100; Indus Instruments, Houston, TX, USA) konnte die Herz- und Atemfrequenz der Tiere überwacht werden. Nach Enthaarung der Bauchdecke und Auftragen des Ultraschallgels (Aquasonic 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) erfolgten die Ultraschall-Aufnahmen mit einem Bildabstand von 50  $\mu\text{m}$  über die gesamte Länge der Endometrioseherde (Abb. 11B). Aus den gewonnenen Bildern wurde durch Bestimmung der Herd- und Zystengrenzen das Gesamtvolumen der Endometrioseherde sowie deren Zysten- und Stromavolumen ( $\text{mm}^3$ ) berechnet.

#### 5.4.2. Größenmessung mittels digitalem Messschieber

Da die mesenterialen Endometrioseherde im Gegensatz zu den peritonealen Herden der Peristaltik des Gastrointestinaltraktes unterworfen waren und somit nicht mittels Ultraschall analysiert werden konnten, wurde zur Größenbestimmung dieser Herde am 28. Untersuchungstag eine Messung mittels digitalem Messschieber (0-150 mm; Technologiezentrum W-tec, Wuppertal, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion Ketamin (75 mg/kg; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun; Bayer) narkotisiert. Nach Eröffnung des Abdomens konnten sowohl die peritonealen (Abb. 12A) als auch die mesenterialen Läsionen (Abb. 12B) mit dem digitalen Messschieber unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH) vermessen werden. Dabei wurde der Längs- und Querdurchmesser der Endometrioseherde bestimmt. Die Größe ( $\text{mm}^2$ ) konnte dann mit der Formel  $d1 \cdot d2 \cdot \pi / 4$  [BECKER et al., 2008] berechnet werden, wobei d1 dem kleineren und d2 dem dazu senkrecht verlaufenden größeren Durchmesser entsprach.



**Abbildung 12:** Zweidimensionale Vermessung typischer Endometrioseherde mittels digitalem Messschieber 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten. **A:** Peritonealer Endometrioseherd (Pfeile). **B:** Mesenterialer Endometrioseherd (Pfeile). Maßstab: 1 mm.

Direkt nach der Messung wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital (200 mg/kg intraperitoneal; Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) getötet und die Endometrioseherde sowie die Ovarien und Uteri für weitere Untersuchungen asserviert.

#### **5.4.3. Histomorphometrie**

Aus den konservierten Endometrioseherden wurden Serienschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (siehe 5.5.1.). Beginnend vom ersten Schnitt wurden die HE-gefärbten Präparate im Abstand von 80 µm mit einem Lichtmikroskop (BZ-8000, Keyence, Osaka, Japan) aufgenommen. Das Ausmessen der einzelnen Flächen erfolgte mit Hilfe der Biozero analysis software (Version 3.60; Keyence). Das Gesamtvolumen sowie das Stroma- und Zystenvolumen der Herde wurde mit der Formel für die trapezoide Interpolation  $V = \frac{1}{2} \times (A + B) \times d$  berechnet. Dabei entsprach A der ausgemessenen Fläche eines Endometrioseherdes auf einem Histologieschnitt, B der ausgemessenen Fläche des Herdes auf dem folgenden Histologieschnitt und d dem Abstand zwischen den beiden Schnitten. Die Summe aller errechneten Volumina ergab schließlich das Gesamtvolumen bzw. das Stroma- oder Zystenvolumen [mm<sup>3</sup>].

### **5.5. Histologie und Immunhistochemie**

#### **5.5.1. HE-Färbung**

Die entnommenen Endometrioseherde wurden für 24 Stunden in 4%-Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und davon anschließend mit Hilfe eines Mikrotoms (Cut 5062; SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland) 2 µm dicke Serienschnitte angefertigt. Diese wurden nach einem Standardprotokoll HE-gefärbt. Bei dieser Färbetechnik werden verschiedene Strukturen des Gewebeschnittes unterschiedlich angefärbt. Hämatoxylin stellt Zellorganellen, die saure Molekülgruppen tragen, blau dar (z.B. Zellkern), während Eosin basische Zellstrukturen, wie z.B. Plasmaproteine, rot markiert.

#### **5.5.2. PCNA-Färbung**

Das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ist ein Zellkern-assoziiertes Protein, das als Co-Faktor der DNA-Polymerase fungiert. Es ist damit in Prozesse der DNA-Replikation, Reparatur und der Zellzyklusregulation eingebunden und wird hauptsächlich während der G1- und S-Phase des Zellzyklus synthetisiert. Da die PCNA-Expression mit der Proliferationsaktivität von Zellen korreliert, wird PCNA als Proliferationsmarker eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden proliferierende Zellen mit einem kreuzreagierenden monoklonalen Maus-anti-Ratte-PCNA-Antikörper als Primärantikörper detektiert (1:200; Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland). Als Sekundärantikörper wurde ein an Biotin-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet (1:100; Abcam, Cambridge, England). Als Chromogen diente 3,3'-

Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Die Gegenfärbung erfolgte mit 1% Methylgrün. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Mikroskops durchgeführt (BX-60; Olympus).

#### **5.5.3. Ki67-Färbung**

Als weiterer Proliferationsmarker wurde Ki67 eingesetzt. Dieser Marker wird während allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert. Die Detektion Ki67-positiver Zellen erfolgte mit einem kreuzreagierenden polyklonalen Kaninchen-anti-Human-Ki67-Antikörper (1:2000; Abcam) gefolgt von einem biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (ready to use; Abcam) als Sekundärantikörper. Als Chromogen diente DAB. Die Gegenfärbung erfolgte mit 1% Methylgrün. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Mikroskops durchgeführt (BX-60; Olympus).

#### **5.5.4. Cleaved Casp-3-Färbung**

Casp-3 ist eine sogenannte Effektorcaspase, die nach Auslösen des Apoptosezyklus aktiviert wird. Dies führt zur Fragmentierung der DNA und somit zum programmierten Zelltod der Zelle. Apoptotische Zellen wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-cleaved Casp-3-Antikörper (1:100; Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) als Primärantikörper markiert. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (ready to use; Abcam). Als Chromogen wurde DAB verwendet. Die Gegenfärbung erfolgte mit 1% Methylgrün. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Mikroskops durchgeführt (BX-60; Olympus).

#### **5.5.5. CD31-Färbung**

Zur Bestimmung der Gefäßdichte in den Endometrioseherden wurde eine CD31-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, PECAM-1) ist ein Transmembranprotein, das hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert wird. Zur Bestimmung der Gefäßdichte wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (1:30; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) und als Sekundärantikörper ein Ziege-anti-Ratte-Indocarbocyanin-Antikörper (1:50; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, UK) eingesetzt. Zur Darstellung der Zellkerne wurde Hoechst 33342 (1:500; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Die gefärbten Schnitte wurden unter einem BZ-8000 Mikroskop (Keyence) zur quantitativen Auswertung der Mikrogefäßdichte (in  $\text{mm}^{-2}$ ) analysiert. Das Ausmessen der einzelnen Flächen erfolgte mit Hilfe der Biozero analysis software (Version 3.60; Keyence).

#### **5.5.6. CD31/PCNA-Doppelfärbung**

Zusätzlich zur Gefäßdichte wurde die Proliferation der Endothelzellen in Endometrioseherden untersucht. Hierzu wurden als Primärantikörper ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (1:30; Dianova GmbH) und ein kreuzreagierender monoklonaler Maus-anti-Ratte-PCNA-Antikörper (1:200; Dako Cytomation) verwendet. Als Sekundärantikörper wurden ein Ziege-anti-Ratte-

AlexaFluor 488-Antikörper (1:200; Invitrogen, Eugene, OR, USA) und ein Ziege-anti-Maus-Indocarbocyanin-Antikörper (1:200; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (1:500; Sigma-Aldrich) gefärbt. Zur Bestimmung des Anteils der PCNA/CD31-positiven Endothelzellen (in %) wurde ein BZ-8000 Mikroskop (Keyence) verwendet.

### 5.6. Western Blot

Zur Analyse der Expression der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) sowie der MAP-Kinase pErk1/2 in Endometrioseherden wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden die Endometrioseherde isoliert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Anschließend wurden die Proben in Lysepuffer [10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100 v/v; Sigma-Aldrich)] homogenisiert, 30 min auf Eis inkubiert und danach 30 min bei 16000xg (4°C) zentrifugiert. In dem gewonnenen Überstand wurde der Gesamtproteingehalt gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry. Dabei wurde Rinderserumalbumin als Standard benutzt. Je 30 µg Protein pro Bande wurden auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese getrennt. Die elektrophoretisch getrennten Proteine konnten anschließend auf Polyvinylidendifluoridmembranen (BioRad, München, Deutschland) übertragen werden. Nach Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen für 4 Stunden mit einem kreuzreagierenden monoklonalen Maus-anti-Human-pErk1/2-Antikörper (1:300; Abcam) oder mit einem kreuzreagierenden monoklonalen Maus-anti-Human-PI3-K-Antikörper (1:300; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) inkubiert. Danach wurde ein HRP (horseradish peroxidase)-konjugierter Sekundärantikörper (1:5000; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Die Detektion chemolumineszierender Signale erfolgte mittels Autoradiographie auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Als interner Standard zur Kontrolle des Proteintransfers wurde ein kreuzreagierender monoklonaler Maus-anti-Human-β-Aktin-Antikörper (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) eingesetzt. Die Auswertung der Signale erfolgte densitometrisch (Gel-Doc; BioRad, München, Deutschland). Die optische Dichte wurde entsprechend der β-Aktin-Konzentration normalisiert und quantifiziert.

### 5.7. Experimentelles Protokoll

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von zwei verschiedenen Polyphenolen auf das Größenwachstum und die Angiogenese von experimentell induzierten Endometrioseherden untersucht:

### 5.7.1. Xanthohumol

Um den Einfluss hormoneller Schwankungen auf die Studienergebnisse auszuschließen, wurden nur Tiere verwendet, die sich im gleichen Zyklusstadium befanden (siehe 5.2.1.). Die Wirkung von Xanthohumol auf das Wachstum von Endometrioseherden wurde in insgesamt 16 Tieren analysiert, die randomisiert in zwei Gruppen (n=8) aufgeteilt wurden. Drei Tage vor Transplantation von Uterusfragmenten zur Induktion der Endometriose wurde mit der Substanzapplikation von 100 µM Xanthohumol-Lösung (Hopsteiner) oder 0,1% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG) als Kontrolle begonnen (siehe 5.3.1.).

Die Induktion der Endometrioseherde erfolgte durch Fixierung von insgesamt vier Uterusfragmenten pro Tier in die Bauchhöhle (siehe 5.2.3.). Hierbei wurden jeweils die Uterusfragmente eines Spendertieres in vier Empfängermäuse transplantiert. Am Tag der Transplantation sowie nach 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden die peritonealen Herde der Tiere sonographisch untersucht (siehe 5.4.1.). Direkt nach der letzten Ultraschalluntersuchung und der Eröffnung des Abdomens der Mäuse wurden die peritonealen und mesenterialen Endometrioseherde mit einem digitalen Messschieber vermessen (siehe 5.4.2.). Die Tiere wurden mit einer Überdosis Pentobarbital getötet und die Herde sowie die Ovarien und Uterushörner entnommen und für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen konserviert.

Aus den erhaltenen Daten der Ultraschalluntersuchungen und der Messung mittels digitalem Messschieber wurden folgende Parameter berechnet:

1. Größe der Endometrioseherde [mm<sup>2</sup>] (siehe 5.4.2.)
2. Gesamtvolumen der Herde [mm<sup>3</sup>] (siehe 5.4.1.)
3. Stromavolumen [mm<sup>3</sup>] (siehe 5.4.1.)
4. Zystenvolumen [mm<sup>3</sup>] (siehe 5.4.1.)
5. Wachstumsrate der Endometrioseherde [%]  
(Gesamtvolumen Tag X / Gesamtvolumen Tag 0 \* 100) - 100
6. Wachstumsrate des Stromagewebes [%]  
(Stromavolumen Tag X / Stromavolumen Tag 0 \* 100) - 100
7. Prozentualer Anteil der Zysten pro Tier [%]  
(Anzahl der zystenenthaltenden Herde \* 100 / Gesamtzahl der Herde)

Von den isolierten Endometrioseherden, Ovarien und Uterushörnern wurden Gewebeschnitte angefertigt. Anschließend erfolgte eine HE-Färbung jedes 10. Gewebeschnittes (siehe 5.5.1.). Zur quantitativen Analyse der Proliferations- und Apoptoserate wurde eine immunhistochemische Färbung mit den Markern PCNA und Casp-3 durchgeführt. Jeweils ein Gewebeschnitt pro Herd wurde

lichtmikroskopisch analysiert und die positiven Zellen als prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl der ausgewerteten Zellen angegeben (siehe 5.5.2. und 5.5.4.). Die Blutgefäßdichte ( $\text{mm}^{-2}$ ) in den Endometrioseherden wurde nach immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung mit dem Endothelzellmarker CD31 ermittelt. Von jedem Endometrioseherd wurden 2 Gewebeschnitte analysiert und davon der Mittelwert gebildet (siehe 5.5.5.). Zusätzlich wurden die Endometrioseherde mit Hilfe einer PCNA/CD31-Doppelfärbung hinsichtlich der Proliferation einzelner Endothelzellen untersucht. Hierzu wurden pro Endometrioseherd auf einem Gewebeschnitt ca. 100 CD31-positive Zellen randomisiert ausgesucht und davon der prozentuale Anteil PCNA-positiver Zellen bestimmt (siehe 5.5.6.).

In einem weiteren Experiment wurde die Expression von PI3-K und der MAP-Kinase pERK1/2 in Xanthohumol-behandelten und Vehikel-behandelten Endometrioseherden untersucht. Hierzu wurden in 3 weiteren Tieren pro Gruppe jeweils 6 peritoneale und 3 mesenteriale Endometrioseherde induziert. Die Uterusfragmente eines Spendertieres wurden zur Transplantation auf jeweils zwei Empfängertiere aufgeteilt. Nach 28 Tagen wurden die Herde entnommen und in flüssigem Stickstoff konserviert. Sowohl die peritonealen als auch die mesenterialen Herde jeder Gruppe wurden gepoolt und die Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse bestimmt (siehe 5.6.).

#### **5.7.2. Resveratrol**

Zur Untersuchung der Wirkung von Resveratrol auf induzierte Endometrioseherde wurden in einem zweiten Studienabschnitt insgesamt 20 Tiere in zwei Gruppen ( $n=10$ ) aufgeteilt. Resveratrol (Biomol) (40 mg/kg gelöst in 100  $\mu\text{l}$  25% Ethanol) oder 25% Ethanol (100  $\mu\text{l}$ ) (Carl Roth GmbH + Co. KG) wurde beginnend vom Tag der Transplantation an einmal täglich intragastral verabreicht.

Die Transplantation der Gewebefragmente, die Ultraschalluntersuchungen, die Messung mittels digitalem Messschieber und die Berechnung sämtlicher Parameter erfolgten wie unter 5.7.1. beschrieben. Nach 28 Tagen wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital getötet und die Endometrioseherde entnommen und konserviert. Nach Anfertigung von Serienschnitten und HE-Färbung wurden die Präparate im Abstand von 80  $\mu\text{m}$  aufgenommen und hinsichtlich der Volumina des Gesamtherdes, des Stromaanteils und des Zystenanteils untersucht (siehe 5.4.3.). Immunhistochemisch wurde die Apoptoserate durch Casp-3-Färbung, die Gefäßdichte mit dem Endothelzellmarker CD31 und die Proliferation der Endothelzellen mittels PCNA/CD31-Doppelfärbung untersucht (siehe 5.7.1.). Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde pro Endometrioseherd ein Gewebeschnitt ausgewertet. Die PCNA- und Ki67-positiven Zellen im Stroma sowie in den Drüsen wurden gezählt und als prozentualer Anteil an der jeweiligen Gesamtzellzahl der betreffenden Zellfraktion angegeben.

### 5.8. Statistik

Zur Berechnung der verschiedenen Parameter wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2000 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Sämtliche Werte wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) angegeben. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels SigmaPlot 2011 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) als Balkendiagramm. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung der SigmaStat Statistical Software (Jandel Scientific, San Jose, CA, USA) durchgeführt.

Bei Normalverteilung der Werte (Shapiro-Wilk-Test) erfolgte der Vergleich zwischen zwei Gruppen mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben. Für nicht normal verteilte Werte wurde der Mann-Whitney-Rangsummen-Test angewendet. Um Unterschiede gemessener Parameter über den Zeitverlauf innerhalb einer Gruppe zu detektieren, wurde eine One-Way Analysis of Variance (ANOVA) für wiederholte Messungen gefolgt von einem post-hoc-Test nach Dunnett durchgeführt, der eine Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers zur Kompensation multipler Vergleiche beinhaltet. Für alle statistischen Analysen wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Wirkung von Xanthohumol auf Endometrioseherde

#### 6.1.1. Dosierung

Die in dieser Arbeit gewählte Applikation von 100  $\mu$ M Xanthohumol *ad libitum* über das Trinkwasser zeigte in einer früheren Tumorstudie bereits einen wachstumshemmenden Effekt [MONTEIRO et al., 2008]. In der hier durchgeführten Studie tranken die Xanthohumol-behandelten Tiere  $4,6 \pm 0,2$  ml und die Tiere der Kontrollgruppe  $5,2 \pm 0,2$  ml ( $p < 0,05$ ) pro Tag. Dies entspricht einer täglichen Dosis von ca. 8 mg/kg Xanthohumol. Diese Dosierung zeigte keine zytotoxischen Effekte, was an einem normalen Schlaf-, Putz- und Fressverhalten sowie durch einen sehr guten Allgemeinzustand der Tiere zu erkennen war. Dementsprechend konnte durch wöchentliche Gewichtskontrolle der Tiere eine physiologische Gewichtszunahme dokumentiert werden (Tab. 1).

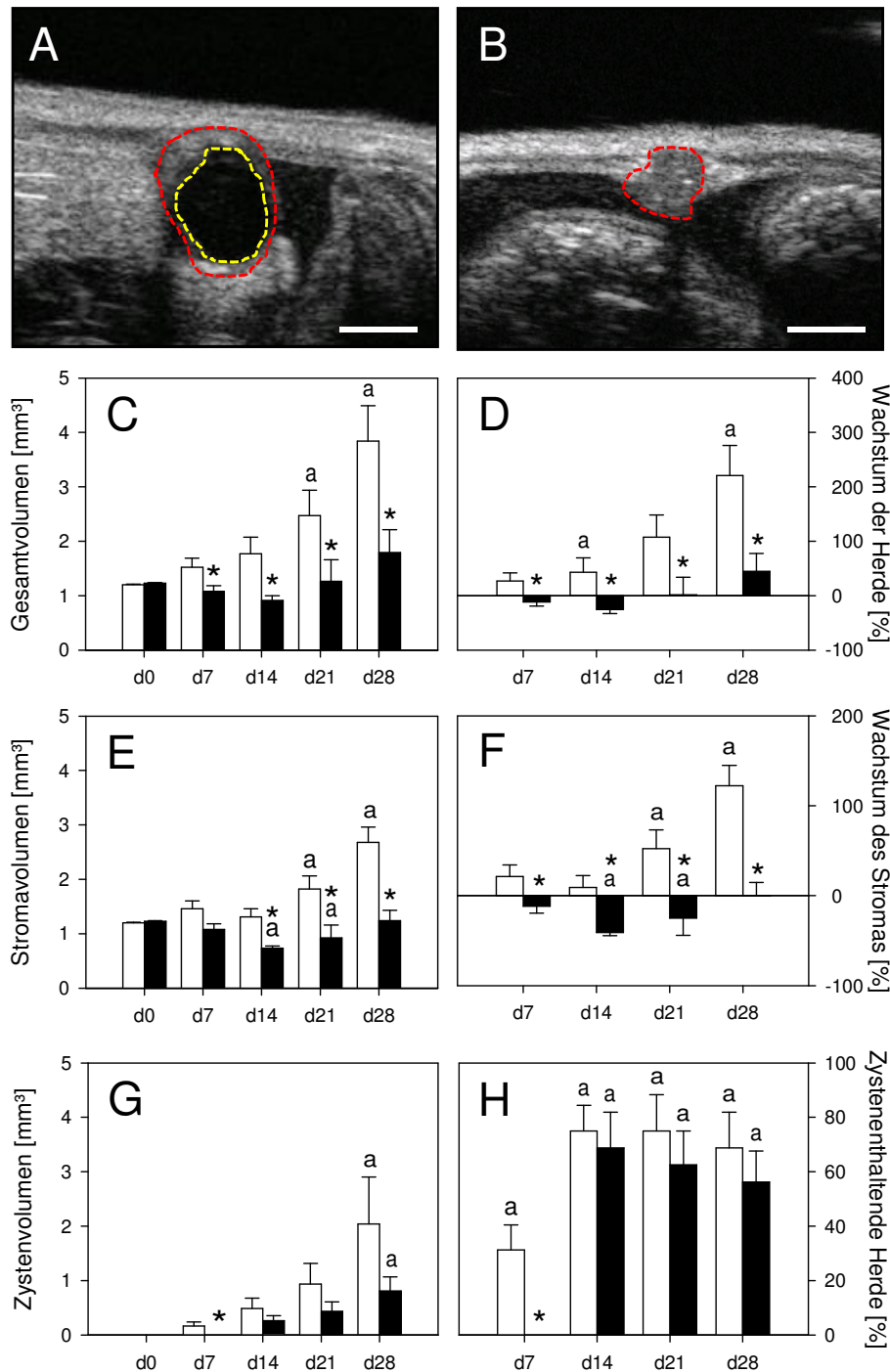
**Tabelle 1:** Wöchentliche Gewichtsentwicklung Xanthohumol- und Vehikel-behandelter Tiere über einen Zeitraum von 28 Tagen. Mittelwert  $\pm$  SEM.

	Kontrolle [g]	Xanthohumol [g]
<b>d0</b>	$18,6 \pm 0,5$	$17,8 \pm 0,5$
<b>d7</b>	$18,1 \pm 0,1$	$18,3 \pm 0,3$
<b>d14</b>	$20,1 \pm 0,4$	$20,0 \pm 0,3$
<b>d21</b>	$20,9 \pm 0,5$	$20,6 \pm 0,4$
<b>d28</b>	$21,4 \pm 0,6$	$21,5 \pm 0,6$

#### 6.1.2. Wachstum der Endometrioseherde

Der erste Abschnitt dieser Studie untersuchte den Einfluss von Xanthohumol auf das Wachstum und die Zystenbildung der Endometrioseherde. Das Volumen der Herde und Zysten wurde mit Hilfe eines hochauflösenden Ultraschallsystems gemessen. Da peritoneale Herde nicht der Peristaltik des Gastrointestinaltraktes unterworfen sind, konnten diese zur repetitiven Untersuchung mittels Ultraschall herangezogen werden. Die quantitative Analyse der Ultraschallbilder zeigte an Tag 0 mit ca.  $1,2 \text{ mm}^3$  vergleichbare Initialvolumina der Transplantate, die sich im Ultraschall als echoreiche, homogene Gewebeareale darstellten. Während der folgenden 28 Tage entwickelten sich die Transplantate zu typischen Endometrioseherden, die durch einen echoreichen stromalen Gewebeanteil und echoarme Zysten charakterisiert waren (Abb. 13A-B).



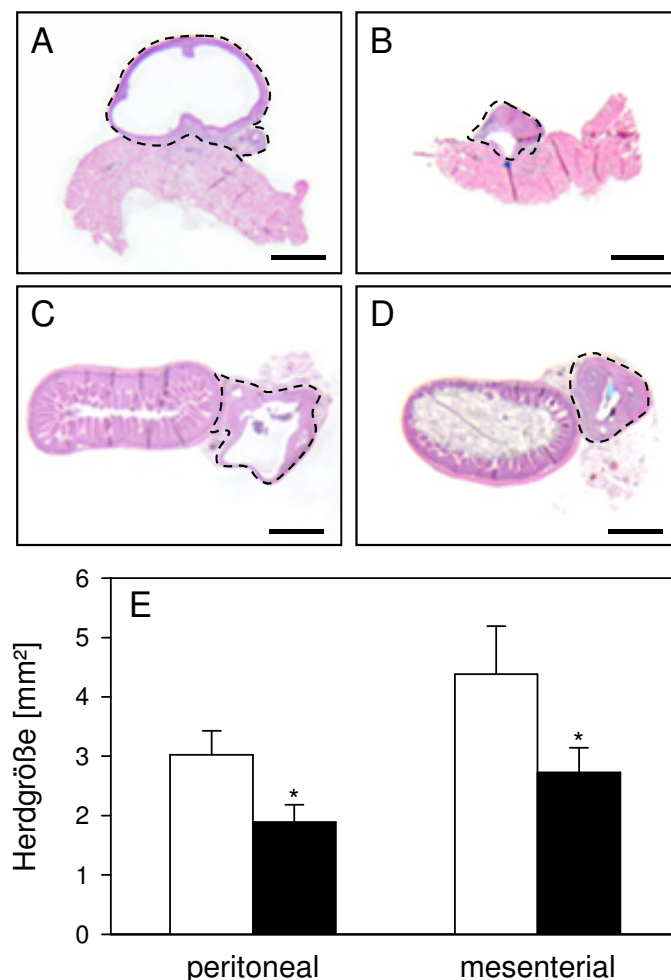


**Abbildung 13:** Repräsentative Ultraschallbilder induzierter Endometrioseherde an Tag 28 (Herdgrenze: rote Linie; Zystengrenze: gelbe Linie) nach Behandlung mit 0,1% Ethanol (Kontrolle, **A**) oder 100  $\mu$ M Xanthohumol (**B**) über das Trinkwasser. Maßstab: 1 mm (**A-B**). **C-H:** Gesamtvolumen (**C**, in  $\text{mm}^3$ ), Wachstum der Herde (**D**, in %), Stromavolumen (**E**, in  $\text{mm}^3$ ), Wachstum des Stromas (**F**, in %), Volumen der Zysten (**G**, in  $\text{mm}^3$ ) und zystenenthaltende Herde (**H**, in %) von Kontrolltieren (weiße Säulen) oder Xanthohumol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils  $n=8$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  versus Kontrolle, <sup>a</sup> $p < 0,05$  versus Tag 0.

Über den gesamten Zeitverlauf konnte eine stetige Volumenzunahme innerhalb der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 13C). Dies war auf ein kontinuierliches Wachstum des Stromagewebes bzw. auf die Zystenbildung innerhalb der Herde zurückzuführen (Abb. 13E und G). Im Gegensatz dazu wiesen die Herde in Xanthohumol-behandelten Tieren ein signifikant kleineres Gesamtvolumen auf,

was auf einen reduzierten Stromaanteil zurückzuführen war (Abb. 13C und E). Dementsprechend ergab sich in dieser Gruppe eine verminderte Wachstumsrate bezogen auf das Gesamtvolumen und den Stromaanteil der Herde (Abb. 13D und F). Verglichen mit den Kontrolltieren war das Zystenvolumen in den Xanthohumol-behandelten Tieren geringer, obwohl in beiden Untersuchungsgruppen eine vergleichbare Anzahl an Zysten zwischen Tag 14 und 28 gefunden wurde (Abb. 13 G-H).

Die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung wurden durch die Größenmessung mittels digitalem Messschieber und histologischen Analysen der Endometrioseherde an Tag 28 bestätigt.



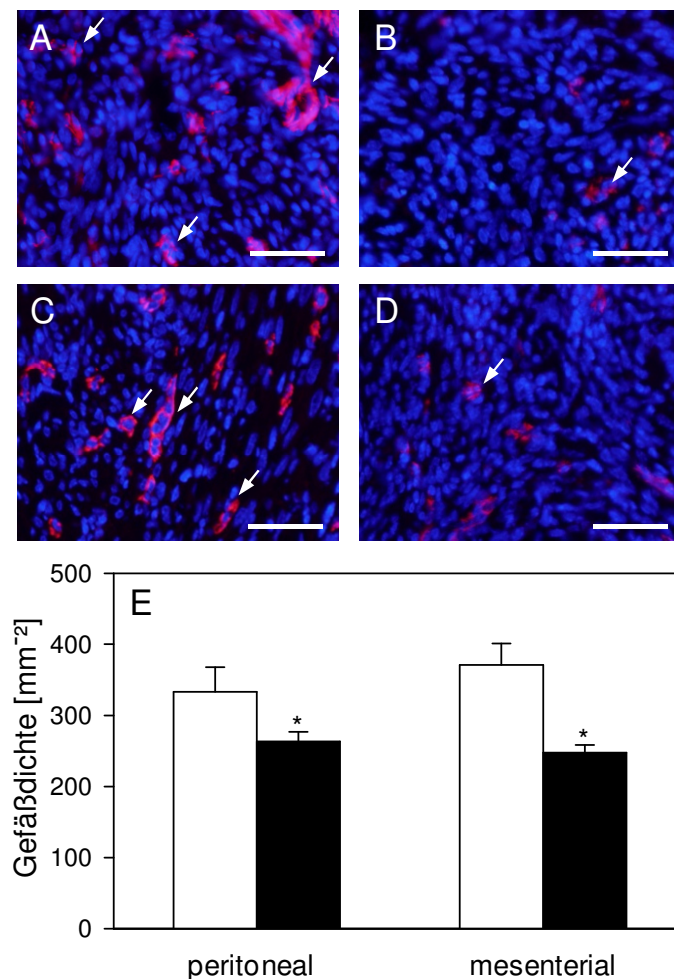
**Abbildung 14:** HE-gefärbte Gewebeschnitte induzierter Endometrioseherde (schwarze Linie) 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten an die Bauchwand (A, B) und das Mesenterium (C, D) von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden mit 0,1% Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 100 µM Xanthohumol (B und D) über das Trinkwasser behandelt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Herde der Mäuse in der Behandlungsgruppe eine geringere Größe aufweisen als die Herde der Kontrollgruppe. Maßstab: 800 µm (A-D). (E) Größe (mm²) der peritonealen und mesenterialen Endometrioseherde von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Xanthohumol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) an Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=8). Mittelwert ± SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

Zusätzlich zu den peritonealen Transplantaten wurden Uterusstanzen am Mesenterium des Dünndarms fixiert. Ebenso wie die peritoneal induzierten Herde entwickelten sich diese zu Endometrioseherden mit dem typischen Drüsen- und Stromaanteil (Abb. 14A-D). Die Messung

mittels digitalem Messschieber zeigte, dass eine Behandlung mit Xanthohumol das Größenwachstum der Herde unabhängig von der Lokalisation hemmt. Die Größe der peritonealen und mesenterialen Herde in den Tieren der Xanthohumol-Gruppe war im Vergleich zu den Herden in der Kontrollgruppe an Tag 28 signifikant kleiner (Abb. 14E).

### 6.1.3. Vaskularisierung der Endometrioseherde

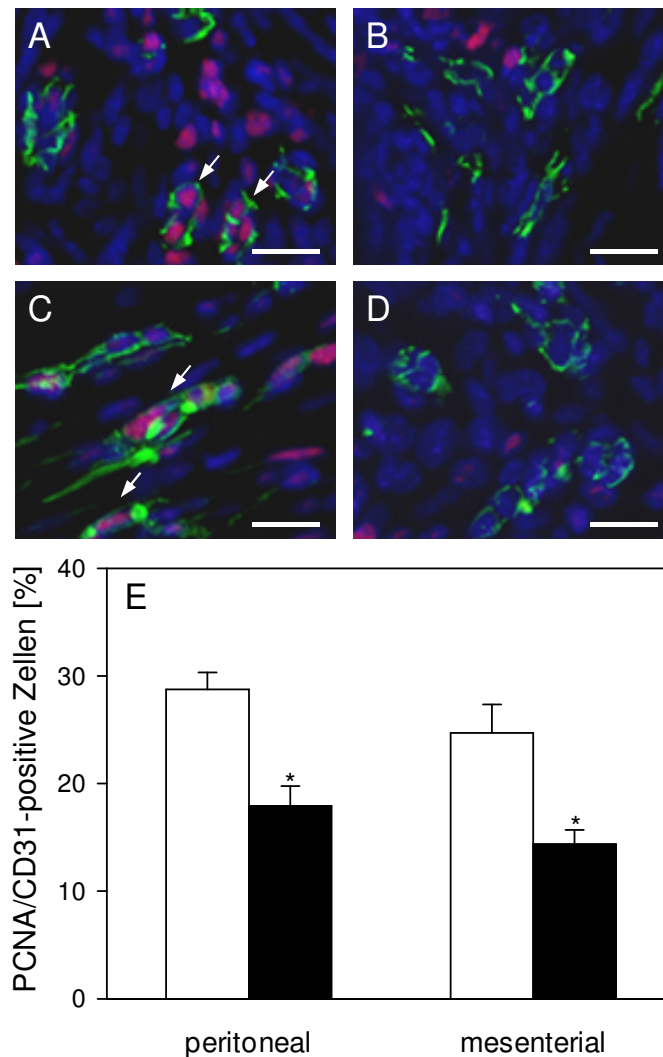
Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, den anti-angiogenen Einfluss von Xanthohumol auf sich entwickelnde Endometrioseherde zu untersuchen.



**Abbildung 15:** Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung CD31-positiver Gefäße in peritonealen (A, B) und mesenterialen Endometrioseherden (C, D) 28 Tage nach Transplantation in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden mit 0,1% Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 100 µM Xanthohumol (B und D) über das Trinkwasser behandelt. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 zur Identifizierung der Zellkerne (blau) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (rot). Es ist deutlich erkennbar, dass die Endometrioseherde der Kontrollgruppe eine höhere Anzahl CD31-positiver Gefäße (Pfeile) aufweisen. Maßstab: 50 µm (A-D). (E): Gefäßdichte (mm<sup>-2</sup>) der peritonealen und mesenterialen Endometrioseherde von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Xanthohumol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=8). Mittelwert ± SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

Hierzu wurde eine immunhistochemische Analyse zum Nachweis des Gefäßmarkers CD31 in Gewebeschnitten von peritonealen und mesenterialen Endometrioseherden durchgeführt und die Gefäßdichte als Parameter der Vaskularisierung berechnet (Abb. 15A-D). Die quantitative Analyse der

CD31-positiven Gefäße zeigte, das Xanthohumol die Bildung neuer Blutgefäße in Endometrioseherden inhibiert (Abb. 15E). Die Anzahl der Gefäße in peritonealen und mesenterialen Herden in Xanthohumol-behandelten Tieren war im Vergleich zu den Kontrolltieren an Tag 28 signifikant reduziert.



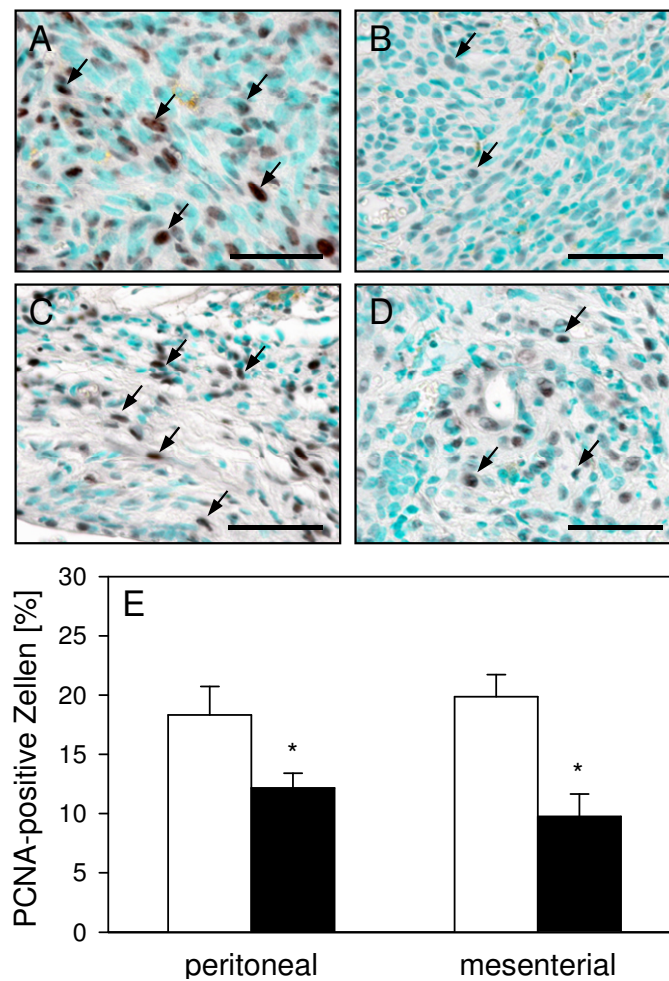
**Abbildung 16:** Immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung PCNA/CD31-positiver Gefäße in peritonealen (A, B) und mesenterialen Endometrioseherden (C, D) 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden mit 0,1% Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 100 µM Xanthohumol (B und D) über das Trinkwasser behandelt. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 zur Identifizierung der Zellkerne (blau), einem Antikörper gegen PCNA zur Färbung proliferierender Zellen (rot) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (grün). Es ist deutlich erkennbar, dass die Anzahl proliferierender CD31/PCNA-doppelpositiver Endothelzellen (Pfeile) innerhalb der Kontrollgruppe höher ist als in der Xanthohumol-Gruppe. Maßstab: 25 µm (A-D). (E): Proliferationsrate CD31-positiver Zellen (%) in peritonealen und mesenterialen Endometrioseherden von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Xanthohumol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=8). Mittelwert ± SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

Um den inhibitorischen Effekt von Xanthohumol auf die Vaskularisierung von Endometrioseherden genauer zu analysieren, erfolgte eine immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung zur Markierung PCNA/CD31-doppelpositiver Endothelzellen. Diese Untersuchung zeigte, dass die verminderte Gefäßdichte nach Xanthohumol-Behandlung durch eine reduzierte Proliferation der

Gefäßendothelzellen verursacht wurde (Abb. 16A-D). In Xanthohumol-behandelten Tieren betrug die Proliferationsrate der Endothelzellen  $17,9 \pm 1,8\%$  in peritonealen und  $14,4 \pm 1,3\%$  in mesenterialen Herden. Im Vergleich dazu waren die Proliferationsraten der Kontrolltiere mit  $28,8 \pm 1,6\%$  in peritonealen und  $24,7 \pm 2,6\%$  in mesenterialen Herden signifikant höher (Abb. 16E).

#### 6.1.4. Zellproliferation und Apoptose in Endometrioseherden

Weiterhin wurde die Wirkung von Xanthohumol auf die Proliferation und Apoptose der Stromzellen in den induzierten Endometrioseherden untersucht.



**Abbildung 17:** Immunhistochemische Färbung PCNA-positiver Zellen in peritonealen (A, B) und mesenterialen Endometrioseherden (C, D) 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden mit 0,1% Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 100 µM Xanthohumol (B und D) über das Trinkwasser behandelt. Die Färbung erfolgte mit Methylgrün zur Identifizierung der Zellkerne (grün) und einem Antikörper gegen PCNA zur Färbung proliferierender Zellen (braun). Es ist deutlich erkennbar, dass die Anzahl proliferierender Zellen (Pfeile) in den Herden der Kontrollgruppe höher ist als in den Herden der Xanthohumol-Gruppe. Maßstab: 50 µm (A-D). (E-F): Proliferationsrate (%) der peritonealen und mesenterialen Endometrioseherde von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Xanthohumol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=8). Mittelwert ± SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

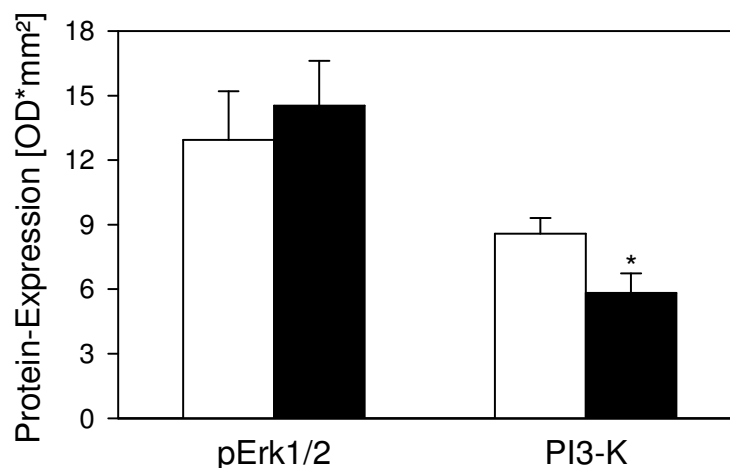
Die quantitative Analyse der PCNA-positiven Zellen zeigte, dass die Proliferationsraten in den peritonealen und mesenterialen Herden der Kontrollgruppe mit  $18,3 \pm 2,4\%$  und  $19,9 \pm 1,9\%$  im

Vergleich zu denen der Xanthohumol-Gruppe mit  $12,2 \pm 1,2\%$  und  $9,8 \pm 1,9\%$  signifikant höher waren (Abb. 17A-E).

Nach immunhistochemischer Färbung von Casp-3 konnte in beiden Gruppen kein positives Signal ( $0,0 \pm 0,0\%$ ) detektiert werden.

#### 6.1.5. Kinaseaktivität in Endometrioseherden

Wie bereits in 6.1.4. gezeigt, übt Xanthohumol einen inhibitorischen Effekt über die Hemmung der Endothelzellproliferation aus. Um den zugrundeliegenden Mechanismus weiter aufzuklären, wurde die Expression von pERK1/2 und PI3-K mit Hilfe eines Western Blots analysiert. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die Expression von pERK1/2 nicht beeinflusst. Es wurde jedoch eine signifikante Hemmung der PI3-K in Endometrioseherden in Xanthohumol-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 18).

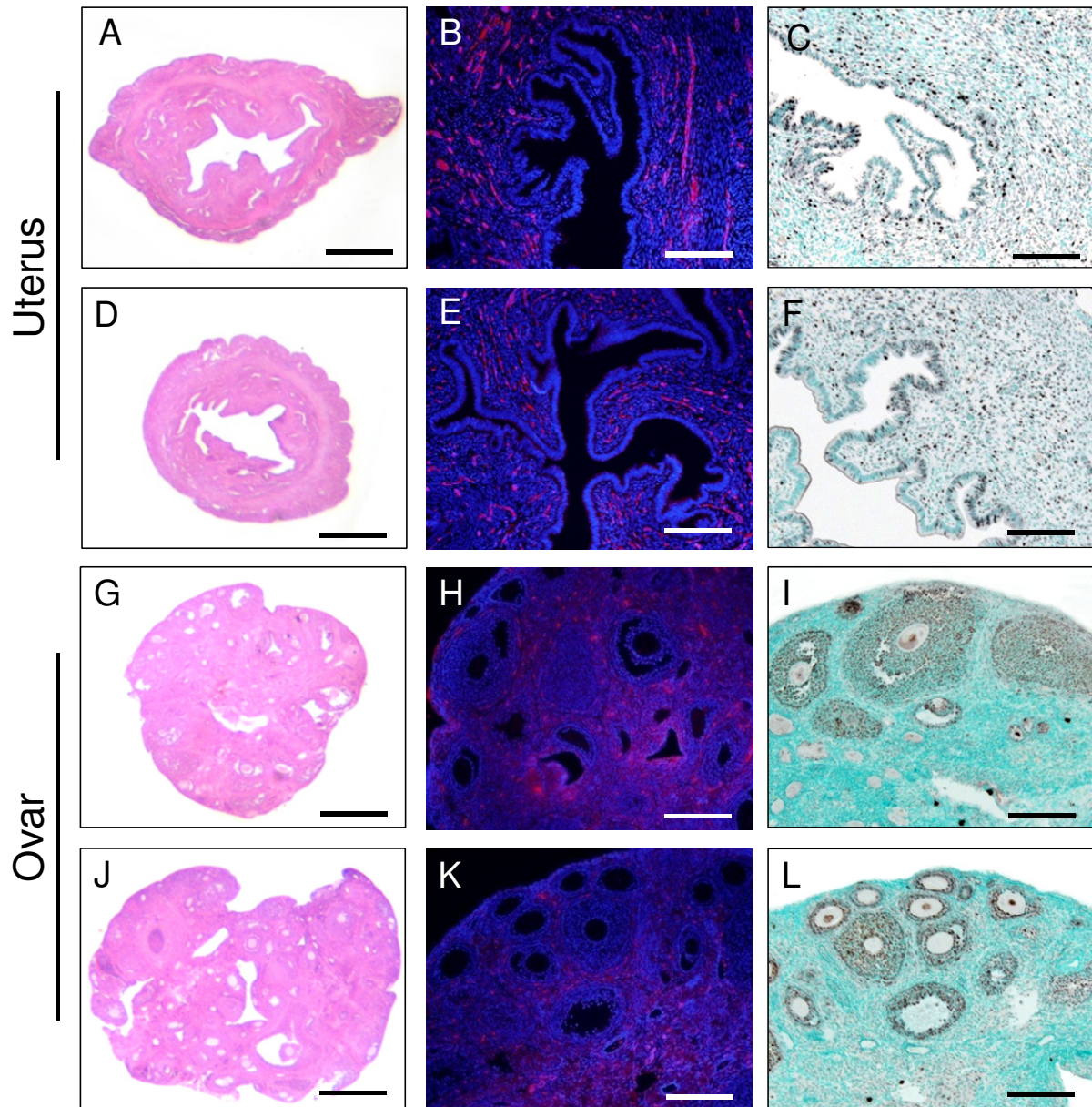


**Abbildung 18:** Expression (Optische Dichte (OD)\*mm<sup>2</sup>) von pErk1/2 und PI3-K in peritonealen und mesenterialen Endometrioseherden 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden mit 0,1% Ethanol (Kontrolle; weiße Säulen) oder 100 µM Xanthohumol (schwarze Säulen) über das Trinkwasser behandelt (Gruppengröße jeweils n=3). Mittelwert  $\pm$  SEM; \*p < 0.05 versus Kontrolle.

#### 6.1.6. Einfluss von Xanthohumol auf die weiblichen Geschlechtsorgane

Da Xanthohumol *in vitro* eine schwach anti-östrogene Aktivität zeigt, wurde zusätzlich dessen Einfluss auf den Uterus und die Ovarien untersucht. Nach histologischer und immunhistochemischer Analyse der Geschlechtsorgane am 28. Tag nach Induktion der Endometrioseherde konnte kein Unterschied zwischen der Xanthohumol-behandelten und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Uterushörner und Ovarien der Tiere aus beiden Gruppen wiesen eine normale Morphologie auf. Auch in Bezug auf die Vaskularisierung und die Zellproliferation unterschieden sich die Reproduktionsorgane der Tiere beider Gruppen nicht (Abb. 19A-L).





**Abbildung 19:** Histologische Gewebeschnitte der Uterushörner (A-F) und Ovarien (G-L) von BALB/c-Mäusen 28 Tage nach Behandlung mit 0,1% Ethanol (A-C, G-I) oder 100 µM Xanthohumol (D-F, J-L) über das Trinkwasser. A, D, G, J: HE-gefärbte Gewebeschnitte. Maßstab: 500 µm; B, E, H, K: Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung CD31-positiver Gefäße. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 zur Identifizierung der Zellkerne (blau) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (rot). Maßstab: 170 µm; C, F, I, L: Immunhistochemische Färbung PCNA -positiver Zellen. Die Färbung erfolgte mit Methylgrün zur Identifizierung der Zellkerne (grün) und einem Antikörper gegen PCNA zur Färbung proliferierender Zellen (braun). Maßstab: 170 µm. Es ist deutlich erkennbar, dass die Uterushörner und Ovarien beider Gruppen eine vergleichbare Histomorphologie, Gefäßdichte und Zellproliferation aufweisen.

## 6.2. Wirkung von Resveratrol auf Endometrioseherde

### 6.2.1. Dosierung

Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Dosis von 40 mg/kg Resveratrol zeigte bereits in vorhergehenden Tumorstudien einen anti-angiogenen Effekt [TSENG et al, 2004; HARIKUMAR et al, 2010]. Die Substanz wurde einmal täglich mittels Knopfkanüle intragastral verabreicht. Über den Zeitraum von 4 Wochen war bei den Tieren ein normales Schlaf-, Putz- und Fressverhalten zu beobachten. Der gute Allgemeinzustand und die physiologische Gewichtszunahme ließen somit auf eine gute Verträglichkeit der Substanz schließen (Tab. 2).

**Tabelle 2:** Wöchentliche Gewichtsentwicklung Resveratrol- und Vehikel-behandelter Tiere über einen Zeitraum von 28 Tagen. Mittelwert  $\pm$  SEM.

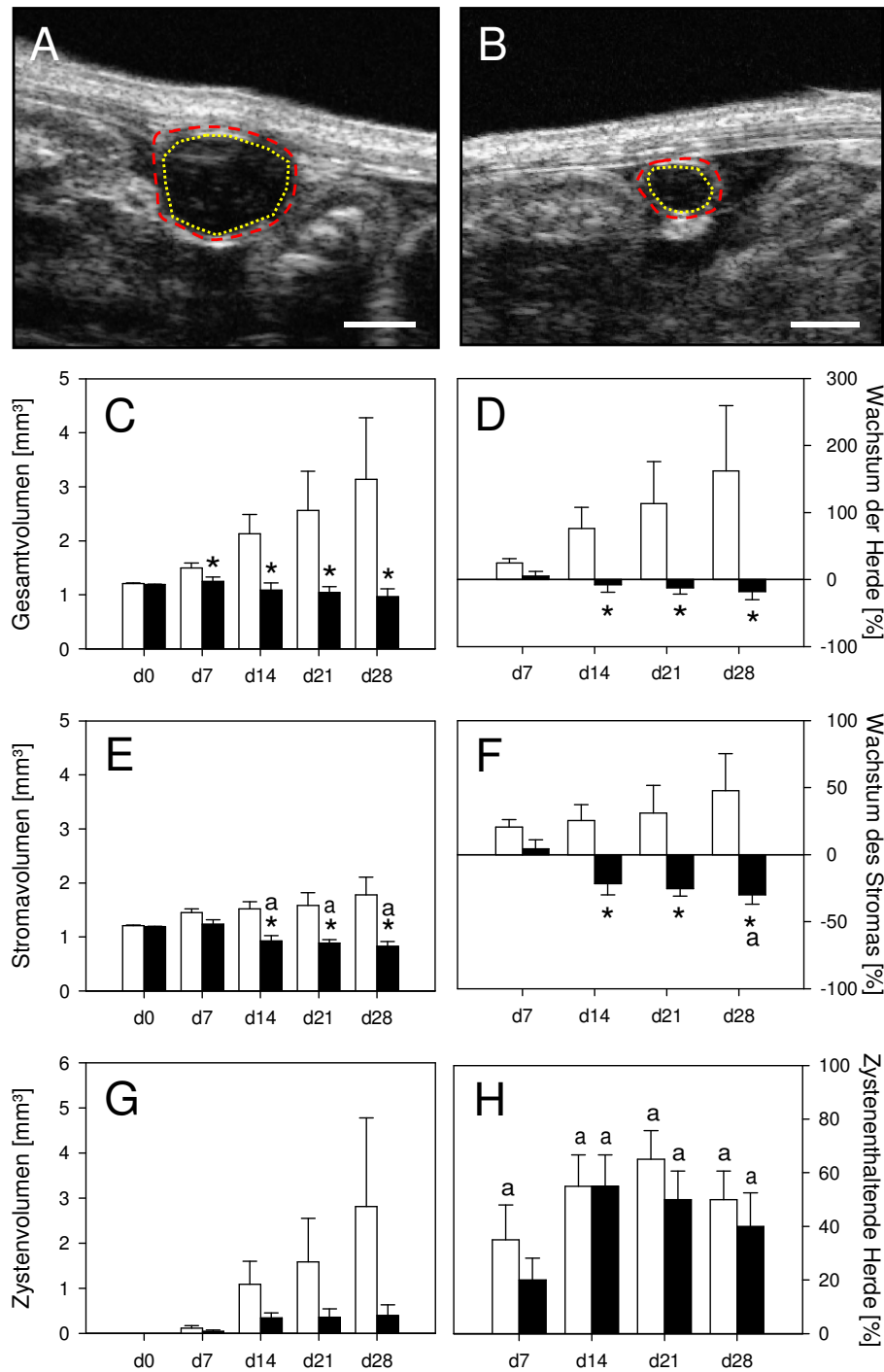
	Kontrolle [g]	Resveratrol [g]
<b>d0</b>	19,7 $\pm$ 0,4	19,9 $\pm$ 0,3
<b>d7</b>	19,7 $\pm$ 0,3	20,0 $\pm$ 0,2
<b>d14</b>	20,3 $\pm$ 0,3	20,8 $\pm$ 0,3
<b>d21</b>	21,0 $\pm$ 0,3	21,3 $\pm$ 0,2
<b>d28</b>	21,2 $\pm$ 0,2	21,8 $\pm$ 0,2

### 6.2.2. Wachstum der Endometrioseherde

In einem zweiten Studienabschnitt wurde der Einfluss von Resveratrol auf das Größenwachstum und die Zystenbildung der Endometrioseherde untersucht. Wie bereits im ersten Studienabschnitt beschrieben wurde das Wachstumsverhalten der peritonealen Endometrioseherde mit Hilfe eines hochauflösenden Ultraschallsystems untersucht. Direkt nach Transplantation des Gewebes wurden vergleichbare Initialvolumina von  $1,19 \pm 0,11 \text{ mm}^3$  in der Resveratrolgruppe und  $1,21 \pm 0,11 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe gemessen. Über den Zeitverlauf von 28 Tagen entwickelten sich typische Endometrioseherde, die sich im Ultraschall durch den echoreichen stromalen Gewebeanteil und echoarmen Zysten darstellten (Abb. 20A-B).

Während des Untersuchungszeitraumes konnte in der Kontrollgruppe ein stetiges Wachstum der Herde festgestellt werden, sodass das Gesamtvolumen bis Tag 28 um das 3-fache anstieg (Abb. 20C-D). Diese Volumenzunahme wurde durch die Proliferation des Stromagewebes (Abb. 20E-F) als auch durch die Entwicklung großvolumiger Zysten verursacht (Abb. 20G-H). Im Gegensatz dazu wurde die Entwicklung der Endometrioseherde in der mit Resveratrol behandelten Gruppe ab Tag 7 deutlich unterdrückt. Durch signifikante Regression des Stromagewebes ab Tag 14 unterschied sich das Gesamtvolumen der Läsionen in der Resveratrol-Gruppe zum Ende des Beobachtungszeitraumes mit  $0,97 \pm 0,14 \text{ mm}^3$  im Vergleich zum Initialvolumen von  $1,19 \pm 0,11 \text{ mm}^3$  an Tag 0 nicht (Abb. 20E).



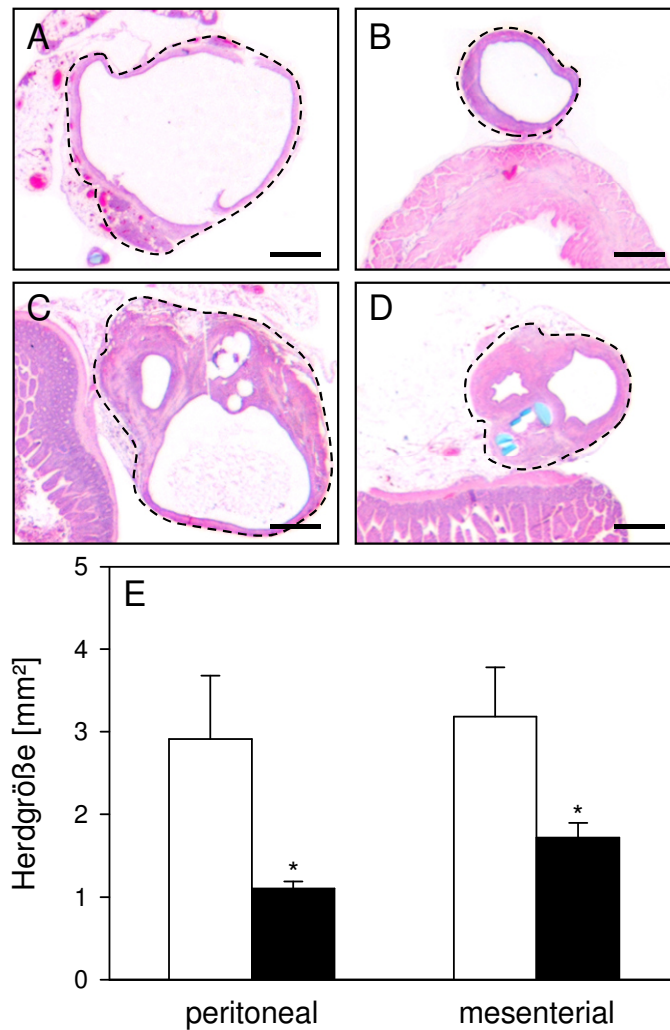


**Abbildung 20:** Repräsentative Ultraschallbilder induzierter Endometrioseherde an Tag 28 (Herdgrenze: rote Linie; Zystengrenze: gelbe Linie) nach intrauteriner Behandlung mit 25% Ethanol (Kontrolle, **A**) oder 40 mg/kg Resveratrol (**B**). Maßstab: 1 mm (**A-B**). **C-H:** Gesamtvolumen (**C**, in mm<sup>3</sup>), Wachstum der Herde (**D**, in %), Stromavolumen (**E**, in mm<sup>3</sup>), Wachstum des Stromas (**F**, in %), Volumen der Zysten (**G**, in mm<sup>3</sup>) und zystenenthaltende Herde (**H**, in %) von Kontrolltieren (weiße Säulen) oder Resveratrol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=10). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  versus Kontrolle, <sup>a</sup> $p < 0,05$  versus Tag 0.

Demzufolge waren das Volumen des Stromas und die Wachstumsrate der Herde zwischen den Tagen 14 und 28 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abb. 20E-F). Interessanterweise wurde in beiden Gruppen eine vergleichbare Anzahl an Zysten detektiert, welche jedoch in Resveratrol-behandelten Tieren ein geringeres Volumen aufwiesen (Abb. 20G-H). Allerdings konnte weder in der

Kontrollgruppe noch in der Behandlungsgruppe eine vollständige Regression der Herde beobachtet werden.

Auch in diesem Studienabschnitt wurde eine histologische Analyse der transplantierten Uterusstanzen durchgeführt.



**Abbildung 21:** HE-gefärbte Gewebeschnitte induzierter Endometrioseherde (schwarze Linie) 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten an die Bauchwand (A, B) und das Mesenterium (C, D) von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden intragastral mit 25 % Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 40 mg/kg Resveratrol (B und D) behandelt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Herde der Mäuse in der Behandlungsgruppe eine geringere Größe aufweisen als die Herde der Kontrollgruppe. Maßstab: 400 µm (A-D). (E) Größe (mm²) der peritonealen und mesenterialen Endometrioseherde von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Resveratrol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=10.) Mittelwert ± SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

In beiden Gruppen entwickelten sich unabhängig von der Transplantationsstelle am Peritoneum und am Mesenterium des Dünndarmes typische Endometrioseherde mit zystisch dilatierten endometrialen Drüsen und einem gut vaskularisierten Stroma (Abb. 21A-D). Sowohl peritoneale als auch mesenteriale Läsionen waren nach Behandlung mit Resveratrol im Vergleich zur Kontrollgruppe kleiner. Die quantitative Analyse der Herdgröße mit Hilfe eines Messschiebers bestätigte diese Beobachtung (Abb. 21E).

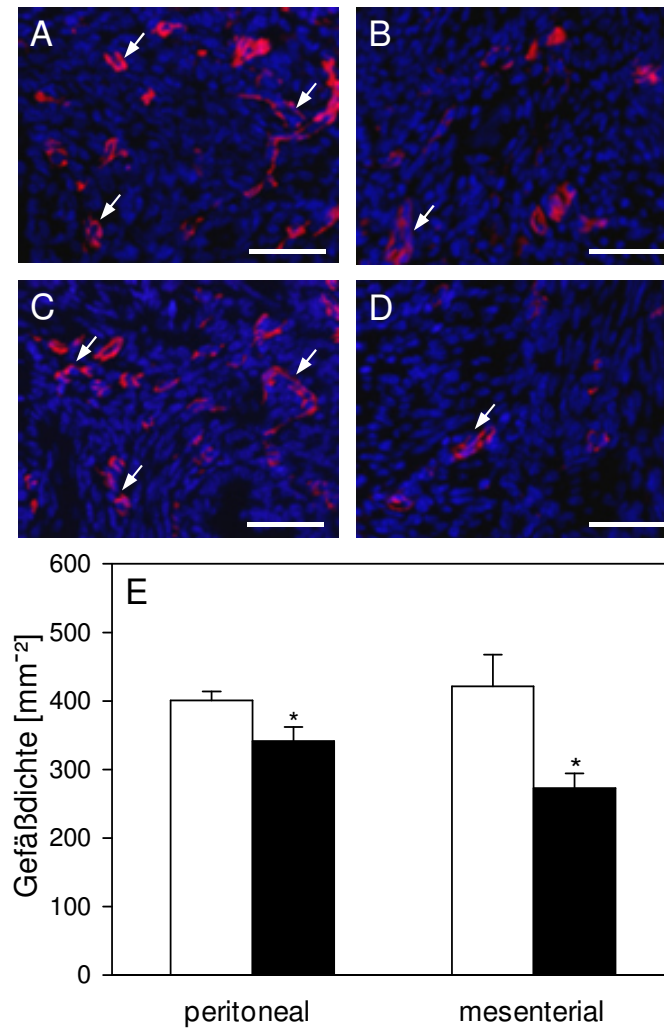
Eine genauere histomorphometrische Analyse zeigte, dass diese Größenreduktion der Herde in den Resveratrol-behandelten Tieren durch ein vermindertes Stroma- und Zystenvolumen hervorgerufen wurde und bestätigt die aus der sonographischen Untersuchung ermittelten Daten (Tab. 3). Im Vergleich zu den Volumina der Ultraschallanalyse wurden die Volumina bei der histomorphometrischen Untersuchung jedoch deutlich unterschätzt, was vermutlich auf die Schrumpfung des Gewebes während der histologischen Aufarbeitung zurückzuführen ist [LASCHKE et al., 2010].

**Tabelle 3:** Histomorphometrische Analyse von Gesamtvolumen (mm<sup>3</sup>), Stromavolumen (mm<sup>3</sup>) und Zystenvolumen (mm<sup>3</sup>) der HE-gefärbten Gewebeschnitte von peritonealen und mesenterialen Endometrioseherden an Tag 28 nach intragastraler Behandlung mit 25% Ethanol (Kontrolle) oder 40 mg/kg Resveratrol (Gruppengröße jeweils n=10). Mittelwert  $\pm$  SEM; \*p< 0,05 versus Kontrolle.

	Kontrolle	Resveratrol
<b>Gesamtvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>		
peritoneal	1,08 $\pm$ 0,46	0,34 $\pm$ 0,12
mesenterial	1,13 $\pm$ 0,34	0,61 $\pm$ 0,15
<b>Stromavolumen [mm<sup>3</sup>]</b>		
peritoneal	0,51 $\pm$ 0,11	0,24 $\pm$ 0,07*
mesenterial	0,64 $\pm$ 0,14	0,39 $\pm$ 0,09
<b>Zystenvolumen [mm<sup>3</sup>]</b>		
peritoneal	0,56 $\pm$ 0,37	0,10 $\pm$ 0,05
mesenterial	0,48 $\pm$ 0,24	0,20 $\pm$ 0,10

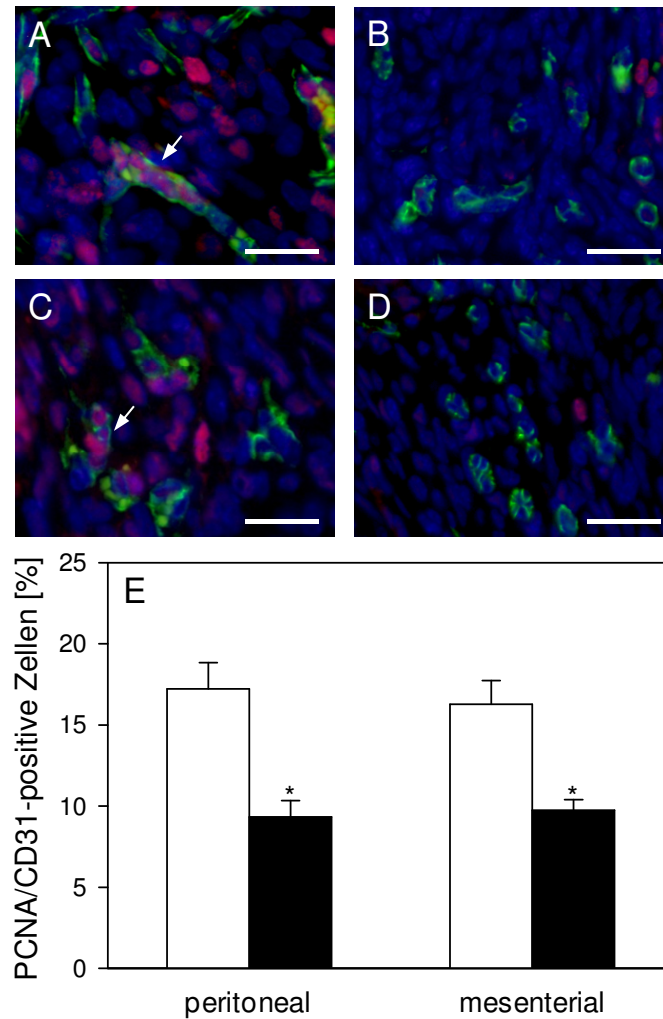
### 6.2.3. Vaskularisierung der Endometrioseherde

Wie schon im ersten Studienabschnitt wurde auch der anti-angiogene Einfluss von Resveratrol auf Endometrioseherde untersucht. Die quantitative Analyse der CD31-positiven Gefäße in Gewebeschnitten peritonealer und mesenterialer Endometrioseherde zeigte einen signifikanten inhibitorischen Effekt der Substanz auf die Bildung neuer Blutgefäße (Abb. 22A-D). In peritonealen und mesenterialen Herden Resveratrol-behandelter Tiere wurde an Tag 28 eine Gefäßdichte von 341  $\pm$  21 mm<sup>-2</sup> und 273  $\pm$  22 mm<sup>-2</sup> im Vergleich zu den Kontrolltieren mit 401  $\pm$  13 mm<sup>-2</sup> und 421  $\pm$  47 mm<sup>-2</sup> ermittelt (p < 0,05) (Abb. 22E).



**Abbildung 22:** Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung CD31-positiver Gefäße in peritonealen (A, B) und mesenterialen Endometrioseherden (C, D) 28 Tage nach Transplantation in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden intragastral mit 25% Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 40 mg/kg Resveratrol (B und D) behandelt. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 zur Identifizierung der Zellkerne (blau) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (rot). Es ist deutlich erkennbar, dass die Endometrioseherde der Kontrollgruppe eine höhere Anzahl CD31-positiver Gefäße (Pfeile) aufweisen. Maßstab: 50  $\mu$ m (A-D). (E): Gefäßdichte (mm<sup>-2</sup>) der peritonealen und mesenterialen Endometrioseherde von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Resveratrol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=10). Mittelwert  $\pm$  SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

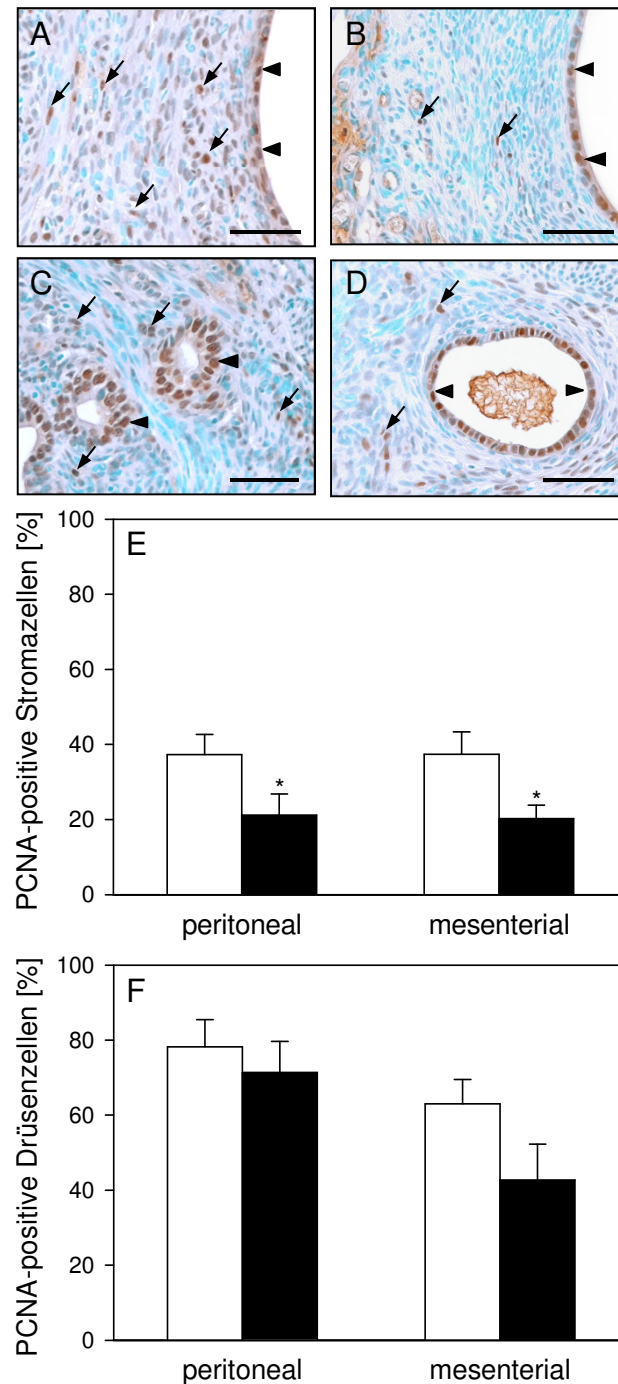
Eine weitere immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung zur Markierung von PCNA/CD31-doppelpositiven Endothelzellen gab Aufschluss über deren Proliferationsfähigkeit (Abb. 23A-D). In Resveratrol-behandelten Tieren beträgt die Proliferationsrate der Endothelzellen  $9,3 \pm 1,0\%$  in peritonealen und  $9,8 \pm 0,7\%$  in mesenterialen Herden. Im Vergleich dazu waren die Proliferationsraten der Kontrolltiere mit  $17,2 \pm 1,6\%$  in peritonealen und  $16,3 \pm 1,5\%$  in mesenterialen Herden signifikant höher (p < 0,05) (Abb. 23E).



**Abbildung 23:** Immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung PCNA/CD31-positiver Gefäße in peritonealen (A, B) und mesenterialen Endometrioseherden (C, D) 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden intragastral mit 25% Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 40 mg/kg Resveratrol (B und D) behandelt. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 zur Identifizierung der Zellkerne (blau), einem Antikörper gegen PCNA zur Färbung proliferierender Zellen (rot) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (grün). Es ist deutlich erkennbar, dass die Anzahl proliferierender CD31/PCNA-doppelpositiver Endothelzellen (Pfeil) innerhalb der Kontrollgruppe höher ist als in der Xanthohumol-Gruppe. Maßstab: 25 µm (A-D). (E): Proliferationsrate CD31-positiver Zellen (%) in peritonealen und mesenterialen Endometrioseherden von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Xanthohumol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=10). Mittelwert ± SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

#### 6.2.4. Zellproliferation und Apoptose in Endometrioseherden

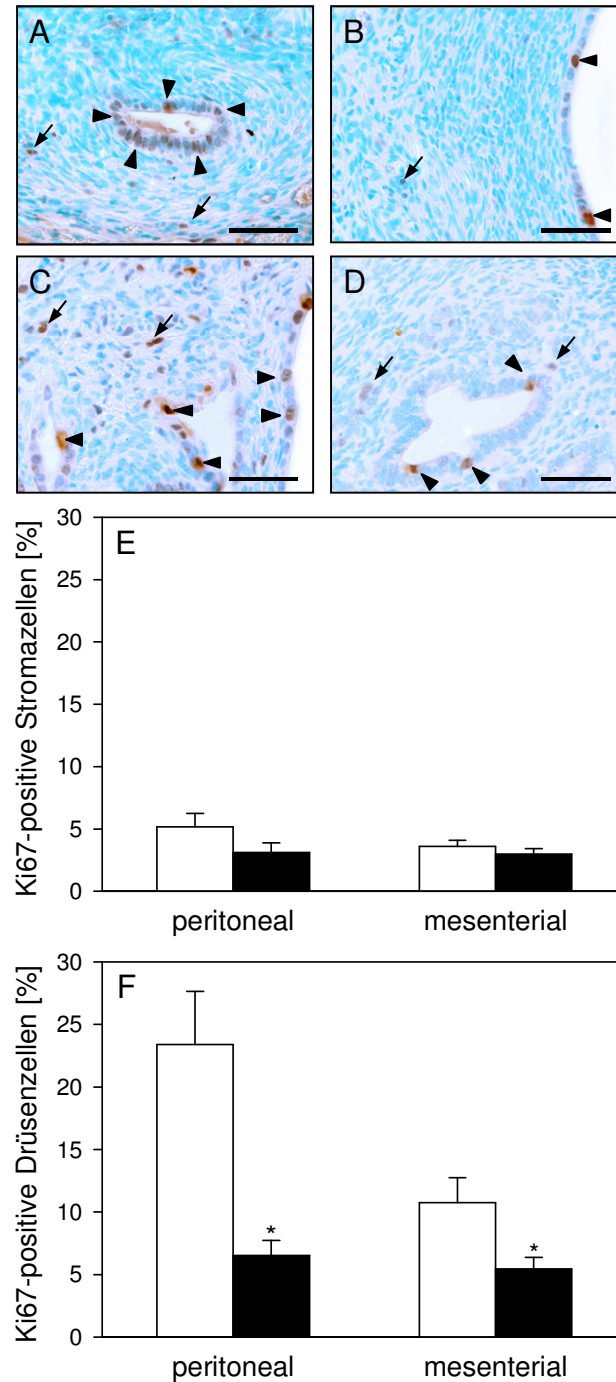
Die Proliferationsrate der Zellen wurde mit Hilfe der Proliferationsmarker PCNA (Abb. 24A-D) und Ki67 (Abb. 25A-D) analysiert. Sowohl in peritonealen als auch in mesenterialen Läsionen der Resveratrolgruppe wurde im Stromagewebe eine signifikant reduzierte Anzahl PCNA-positiver Zellen detektiert. Die Proliferationsraten innerhalb der Behandlungsgruppe betrug  $21,2 \pm 5,6\%$  (peritoneal) und  $20,3 \pm 3,5\%$  (mesenterial) versus  $37,3 \pm 5,4\%$  und  $37,4 \pm 6,0\%$  in der Kontrollgruppe (Abb. 24E). Bezüglich der proliferativen Aktivität der Drüsenzellen beider Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 24F).



**Abbildung 24:** Immunhistochemische Färbung PCNA-positiver Zellen in peritonealen (A, B) und mesenterialen Endometrioseherden (C, D) 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden intragastral mit 25% Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 40 mg/kg Resveratrol (B und D) behandelt. Die Färbung erfolgte mit Methylgrün zur Identifizierung der Zellkerne (grün) und einem Antikörper gegen PCNA zur Färbung proliferierender Zellen (braun). Es ist deutlich erkennbar, dass die Anzahl proliferierender Zellen (Stromazellen: Pfeil; Drüsenzellen: Pfeilspitze) in den Herden der Kontrollgruppe höher ist als in den Herden der Xanthohumol-Gruppe. Maßstab: 50 µm (A-D). (E-F): Proliferationsrate (%) der peritonealen und mesenterialen Endometrioseherde von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Resveratrol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) in Stromazellen (E) und Drüsenzellen (F) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=10). Mittelwert ± SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

Wie erwartet, war die Expression von Ki67 in den Endometrioseherden wesentlich geringer, da Ki67 im Gegensatz zu PCNA ein spezifischerer Proliferationsmarker ist [KORDEK et al., 1996].





**Abbildung 25:** Immunhistochemische Färbung Ki67-positiver Zellen in peritonealen (A, B) und mesenterialen Endometrioseherden (C, D) 28 Tage nach Transplantation von Uterusfragmenten in die Bauchhöhle von BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden intragastral mit 25% Ethanol (Kontrolle; A und C) oder 40 mg/kg Resveratrol (B und D) behandelt. Die Färbung erfolgte mit Methylgrün zur Identifizierung der Zellkerne (grün) und einem Antikörper gegen Ki67 zur Färbung proliferierender Zellen (braun). Es ist deutlich erkennbar, dass die Anzahl proliferierender Zellen (Stromazellen: Pfeil; Drüsenzellen: Pfeilspitze) in den Herden der Kontrollgruppe höher ist als in den Herden der Xanthohumol-Gruppe. Maßstab: 50  $\mu$ m (A-D). (E-F): Proliferationsrate (%) der peritonealen und mesenterialen Endometrioseherde von Kontrolltieren (weiße Säulen) und Resveratrol-behandelten Tieren (schwarze Säulen) in Stromazellen (E) und Drüsenzellen (F) am Tag 28 (Gruppengröße jeweils n=10). Mittelwert  $\pm$  SEM; \*p < 0,05 versus Kontrolle.

Im Drüsenepithel peritonealer als auch mesenterialer Herde Resveratrol-behandelter Tiere wurde mit  $6,5 \pm 1,2\%$  und  $5,5 \pm 0,9\%$  versus  $23,4 \pm 4,3\%$  und  $10,8 \pm 2,0\%$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

eine signifikant reduzierte Proliferationsrate gemessen (*Abb. 25F*). Innerhalb des Stromagewebes wurde kein Unterschied gefunden (*Abb. 25E*).

Nach immunhistochemischer Färbung von Casp-3 konnten an Tag 28 keine positiven Zellen in den Endometrioseherden beider Gruppen detektiert werden.

### 6.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde erstmals die Wirkung von Xanthohumol und Resveratrol auf das Größenwachstum und die Entwicklung neuer Blutgefäße von Endometrioseherden im murinen Tiermodell untersucht. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Mittels hochauflösendem Ultraschall konnte die Größenentwicklung peritonealer Endometrioseherde repetitiv über einen Zeitraum von 28 Tagen analysiert werden. Dabei war die Differenzierung zwischen Stromaanteil und Zystenanteil gut möglich. Sowohl Xanthohumol als auch Resveratrol inhibierten das Wachstum peritonealer Endometrioseherde. Über den Zeitverlauf konnten in den Behandlungsgruppen signifikant reduzierte Gesamtvolumina der Herde im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden.
2. Die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung wurden durch die Messung mittels eines digitalen Messschiebers bestätigt. Zusätzlich zu den peritonealen Herden wurden mesenteriale Endometrioseherde induziert und vermessen. Unabhängig von der Lokalisation der Endometrioseherde konnte ein inhibitorischer Effekt beider Substanzen auf die Größe der Herde festgestellt werden. Für die Endometrioseherde in Resveratrol-behandelten Tieren wurde dies zusätzlich durch eine histomorphometrische Analyse bestätigt.
3. Xanthohumol und Resveratrol haben eine inhibitorische Wirkung auf die Vaskularisierung peritonealer und mesenterialer Endometrioseherde. Die quantitative Analyse CD31-positiver Zellen zeigte nach 28 Tagen eine reduzierte Gefäßdichte in den behandelten Herden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weitergehende Untersuchungen konnten belegen, dass diese anti-angiogene Wirkung auf einer Reduktion der Proliferationsfähigkeit der Endothelzellen beruhte.
4. Beide Phytosubstanzen wirkten anti-proliferativ. Endometrioseherde Xanthohumol-behandelter Tiere wiesen an Tag 28 eine deutlich reduzierte Anzahl PCNA-positiver Zellen auf. In Resveratrol-behandelten Tieren war die Proliferationsrate der Stromazellen an Tag 28 geringer als in der Kontrollgruppe, wohingegen in Drüsenzellen kein Unterschied nachgewiesen werden konnte. Als weiterer spezifischer Proliferationsmarker wurde Ki-67



eingesetzt. Hier zeigte sich 28 Tage nach Resveratrolbehandlung in den Endometrioseherden ein signifikanter Unterschied an Ki-67-positiven Signalen in den Epithelzellen der Drüsen. Die Anzahl Ki-67-positiver Zellen im Stromagewebe war in beiden Gruppen gleich.

5. Zur Identifizierung der intrazellulären Signalkaskaden, welche die anti-proliferative und anti-angiogene Wirkung von Xanthohumol vermitteln, wurden Proteine des PI3-K/AKT- und des MAPK/ERK-Signalweges untersucht. Beide Signaltransduktionswege sind an der Regulation des Zellwachstums und der Angiogenese beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die Expression von PI3-K jedoch nicht die Expression von pERK1/2 in Endometrioseherden inhibiert.

## 7. Diskussion

### 7.1. Diskussion von Material und Methoden

#### 7.1.1. Tierexperimentelle Endometriosemodelle

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Wirkung von Xanthohumol und Resveratrol auf die Vaskularisierung und Größenentwicklung von Endometrioseherden im Tiermodell untersucht. Die Endometriose ist eine häufige gynäkologische Erkrankung, deren Pathogenese und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bislang nicht vollständig aufgeklärt wurden. Sie gilt jedoch als östrogenabhängige und angiogene Erkrankung, da das Wachstum des ektopen Endometriums durch Östradiol stimuliert wird und das Überleben des Gewebes von der Bildung neuer Blutgefäße und der damit verbundenen Sauerstoffversorgung abhängig ist. Zur Analyse pathogenetischer Mechanismen der Endometriose und für die Evaluierung neuer Medikamente zur Behandlung der Erkrankung wurden in den letzten Jahren verschiedene experimentelle Tiermodelle eingesetzt.

Eine Voraussetzung für die Entwicklung einer Endometriose ist die Menstruation, sodass diese Erkrankung spontan nur im Menschen oder Primaten entsteht [GRÜMMER, 2006]. Zur Erforschung grundlegender Mechanismen der Endometriose wurden verschiedene Primaten-Modelle eingesetzt [STORY und KENNEDY, 2004]. Obwohl speziell Primaten-Modelle dem Menschen in Bezug auf Anatomie, Fortpflanzung und Immunstatus sehr gut entsprechen, sind die hohen Kosten für die Haltung der Tiere, Studiendurchführung sowie das geringe Vorkommen spontaner Endometriosen ein limitierender Faktor. Auf Grund dieser Limitationen wurden neue Endometriosemodelle durch Transplantation von Endometrium entwickelt [GRÜMMER, 2006].

Ein weit verbreitetes Modell ist das der Chorioallantoismembran (CAM) des befruchteten Hühnereies. Nach Transplantation von humanem Endometrium auf die CAM entwickeln sich typische Endometrioseherde mit endometrialen Drüsen und Stromazellen wobei die Unversehrtheit des Gewebes eine wesentliche Voraussetzung für die Implantation auf der Membran darstellt [MAAS et al., 2001; NAP et al., 2003]. Da die CAM ein dichtes mikrovaskuläres Gefäßnetzwerk aufweist, ermöglicht dieses Modell differenzierte Beobachtungen zur Angiogenese von humanem Endometrium. In mehreren Studien wurden dabei verschiedene Angiogenese-relevante Faktoren wie VEGF [KRESSIN et al., 2001], MMP-1 und -2 [WOLBER et al., 2003] sowie Ang-1 und -2 [DRENKHAHN et al., 2004] identifiziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass anti-angiogene Substanzen wie anti-VEGF-Antikörper, TNP-470, Endostatin und Anginex die Vaskularisierung der Transplantate reduziert [NAP et al., 2005]. Deutliche Vorteile des CAM-Assay liegen in der einfachen Durchführung des Versuches und der Möglichkeit, die Entwicklung neuer Blutgefäße repetitiv zu untersuchen.

Ein weiteres Modell zur repetitiven, nicht-invasiven Analyse der Angiogenese ist die Rückenhautkammer, die ursprünglich zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Zellen und Tumorimplantaten entwickelt wurde [SANDISON, 1928; ALGIRE, 1943; ARFORS et al., 1943]. In den vergangenen Jahrzehnten wurde das Modell zur Analyse der Mikrohämodynamik eines Gefäßsystems bestehend aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen an Ratten [PAPENFUSS et al., 1979], Nacktmäusen [LEHR et al., 1993] und am Hamster [ENDRICH et al., 1980] etabliert. Die Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer von Syrischen Goldhamstern ermöglicht *in vivo* die Visualisierung der Neovaskularisierung und die quantitative Analyse mikrohämodynamischer Parameter der Mikrozirkulation in Endometrioseherden [LASCHKE et al., 2005]. Somit stellt dieses Modell ebenfalls einen vielversprechenden Ansatz zur Testung anti-angiogener Substanzen zur Therapie der Endometriose dar. Mit Hilfe dieses Modells konnte bereits nachgewiesen werden, dass selektive COX-2-Inhibitoren [LASCHKE et al., 2007; LASCHKE et al., 2006b], Hemmstoffe der Proteinkinase CK2 [FENG et al., 2012] und Phytosubstanzen wie HBA [LASCHKE et al., 2011] und EGCG [LASCHKE et al., 2008] die Vaskularisierung und Zellproliferation in transplantierten Endometriumfragmenten inhibieren und somit eine Regression sich entwickelnder Endometrioseherde induzieren.

Sowohl die Rückenhautkammer als auch das CAM-Modell haben jedoch entscheidende Nachteile. Die Transplantationsstelle der Endometriumfragmente entspricht nicht der physiologischen Umgebung innerhalb des Bauchraumes. Deshalb werden die immunologischen Interaktionen zwischen Endometrium und Peritoneum, die einen Einfluss auf die Entstehung einer Endometriose haben könnten, in diesen Modellen nicht widerspiegelt. Da es sich bei der CAM um embryonales Gewebe handelt, ist das Immunsystem nicht vollständig ausgebildet. Dadurch unterscheidet sich das Wachstumsfaktorprofil von dem des adulten Organismus und ebenso auch von dem der Peritonealflüssigkeit. Ein weiterer Nachteil ist der limitierte Untersuchungszeitraum von 10 Tagen für das CAM-Modell und 14-21 Tagen für die Rückenhautkammer.

Untersuchungen über einen längeren Zeitraum können im Modell der intraperitonealen Endometriose durchgeführt werden, bei dem Endometriumfragmente in die Bauchhöhle transplantiert werden. Das erste autologe Endometriose-Modell wurde in Kaninchen etabliert, wobei Gewebefragmente eines Uterushornes an das Peritoneum transplantiert wurden [SCHENKEN und ASCH, 1980]. Nach einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen wurden die Transplantate histologisch als Endometrioseherde charakterisiert. Dieses Modell wurde von VERNON und WILSON [1985] für die Ratte und von STEINLEITNER et al. [1991] für Syrische Goldhamster adaptiert. Ein erstes autologes Mausmodell etablierten CUMMINGS und METCALF [1995]. Dabei wurden

Uterusfragmente in den Bereich der intestinalen Mesenterialgefäße transplantiert. Dieses Modell wurde in einer Vielzahl von Studien weiterentwickelt.

In heterologen Mausmodellen wird humanes Gewebe [GRÜMMER et al., 2001; NISOLLE et al., 2000a; BRUNER et al., 1997] oder Endometrium aus Menstrualblut [EGGERMONT et al., 2005; VAN LANGENDONCK et al., 2004; NISOLLE et al., 2000b] in die Bauchhöhle von immundefizienten Mäusen transplantiert. Da viele Faktoren zur Entstehung einer Endometriose beitragen, können in diesem Modell gezielt zelluläre Mechanismen untersucht werden, welche die Veränderung und Anpassung des humanen Gewebes nach der Implantation beeinflussen. Darüber hinaus eignen sich heterologe Nagermodelle, um Effekte therapeutischer Targets auf das humane Gewebe zu analysieren. Nachteilig wirkt sich jedoch das fehlende Immunsystem der Tiere aus. Da die Endometriose auch als eine inflammatorische Erkrankung gilt, ist dieses Modell nicht geeignet, die immunologischen Interaktionen zwischen ektopem Gewebe und Implantationsstelle widerzuspiegeln. Dies konnte in Studien gezeigt werden, die den Effekt von immunregulatorischen Substanzen auf Endometrioseherde untersuchten. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass COX-2-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Größenentwicklung ektoper Endometrioseherde in Nacktmäusen haben [HULL et al., 2005]. Um solche Studien durchzuführen werden, homologe Mausmodelle verwendet.

Hierbei werden Endometriumfragmente aus dem Uterus eines Tieres isoliert und in dasselbe Tier (autolog) bzw. von einem Spendertier in ein Empfängertier (syngen) transplantiert. Nachteilig kann sich hierbei ein unterschiedlicher Hormonstatus der Spender und Empfängertiere auswirken, der das Wachstum der Transplantate beeinflusst. Die autologe Transplantation umgeht dieses Problem, wobei der chirurgische Eingriff der Uterusresektion immunologische Veränderungen durch eine induzierte Entzündung im Bauchraum hervorrufen kann. Vorteile des syngen Mausmodells ist jedoch die Möglichkeit, eine hohe Anzahl an genetisch identischen Tieren über einen längeren Zeitraum analysieren zu können, sowie vergleichsweise geringe Kosten für die Tierbeschaffung und Haltung [GRÜMMER, 2006]. Darüber hinaus eignet sich das Modell, um die Effekte therapeutischer, immunmodulatorischer und anti-angiogener Substanzen zu untersuchen.

Intraperitoneale Endometrioseherde können auf verschiedene Arten induziert werden. Nach Ablösen des Endometriums vom Myometrium werden Endometriumfragmente suspendiert und in die Bauchhöhle injiziert [SOMIGLIANA et al., 1999]. Allerdings ist die geringe Anwachsrate der Gewebefragmente sowie die geringe Wiederfindungsrate ein entscheidender Nachteil dieser Methode. Zur besseren Bestimmung der Lokalisation und Größe von Endometrioseherden transplantierte HIRATA et al. [2005] GFP-positives Gewebe in Wildtyp-Mäuse. Eine weitere Möglichkeit zur Induktion von Endometrioseherden besteht darin, Uterusfragmente am Peritoneum

anzunähen [GRÜMMER et al., 2001]. Durch die Fixierung wird das Auffinden der Fragmente deutlich erleichtert. Die Transplantation von Uterusgewebe im Bereich der Blutgefäße des Mesenteriums führt dabei zu einer besseren Blutversorgung der Transplantate [STOECKEMANN et al., 1995].

Zur Untersuchung des Effektes von Xanthohumol und Resveratrol auf sich entwickelnde Endometrioseherde wurden in der vorliegenden Arbeit Endometrioseherde durch die syngene Transplantation von isoliertem Endometrium an das Peritoneum der Bauchwand und das Mesenterium des Dünndarmes induziert.

### **7.1.2. Ultraschall-Analyse**

Die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung der Endometriose setzt die repetitive Untersuchung von Endometrioseherden in Tiermodellen mit sensitiven Nachweismethoden voraus. Diese wiederholten Kontrollen erlauben eine präzise Beobachtung des Krankheitsverlaufes und entsprechen der klinischen Diagnostik, bei der die Größenentwicklung der Herde einen wichtigen Parameter zur Stadieneinteilung und zur Überprüfung des Behandlungserfolges darstellt. Lange Zeit war die Vermessung von Endometrioseherden mittels Schieblehre die Standardmethode zur Ermittlung des Größenwachstums in präklinischen Tiermodellen. Hierbei wird der größte (D1) und der dazu rechtwinklige, kleinste Durchmesser (D2) eines Herdes gemessen und die Oberfläche mit der Ellipsoidformel  $D1 \times D2 \times \pi / 4$  berechnet [BECKER et al., 2006]. Diese Methode ist jedoch nicht zur repetitiven Untersuchung von Endometrioseherden geeignet, da hierzu wiederholte Laparotomien notwendig wären. Dabei könnten induzierte Entzündungen, ausgelöst durch die Transplantation des Uterusgewebes, verstärkt werden. Dies führt zu erhöhten Konzentrationen von proinflammatorischen Mediatoren in der Peritonealflüssigkeit, die das Wachstum der Endometrioseherde beeinflussen [ZHOU et al., 2010]. Nachteilig wirkt sich auch die hohe Heterogenität der Herdform bei der zweidimensionalen Messung aus, da nicht jeder Herd eine ellipsoide Form aufweist. Weiterhin weist die Messung mit Schieblehre hohe Interobserver-Variabilität auf.

Wiederholte Analysen von Endometrioseherden am selben Tier lassen sich minimal-invasiv mit konfokaler Laserendomikroskopie durchführen. Dies ermöglicht die real-time *in vivo*-Mikroskopie des Gewebes, wobei mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen die Vaskularisierung der Transplantate analysiert werden kann. Zusätzlich ist *in vivo* die immunhistochemische Darstellung molekularer Targets möglich [WANG et al., 2013]. Diese Technik ermöglicht eine Vielzahl verschiedener Analysen während eines Untersuchungszeitpunktes, ist aber ebenfalls mit wiederholten chirurgischen Eingriffen verbunden, die sich negativ auf die physiologische Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit auswirken können.

Um diese Probleme zu umgehen, entwickelte BECKER et al. [2006] basierend auf der Messung von Biolumineszenz ein nicht-invasives Modell zur repetitiven Untersuchung von Endometrioseherden. Hierbei werden Luziferase-exprimierende transgene Tiere verwendet, deren Uterusgewebe in Wild-Typ-Mäuse transplantiert wird. Durch Injektion von Luziferin wird ein spezifisches Lichtsignal in den Transplantaten erzeugt, das durch die Bauchwand detektiert werden kann. Die Intensität des Signales korreliert mit der Position und der Größe der Transplantate. Jedoch ist für die Biolumineszenz-Bildgebung die Verwendung transgenen Gewebes Voraussetzung.

Eine weitere Möglichkeit zur Messung intraperitonealer Endometrioseherde ist die Magnetresonanztomographie (MRT), wobei eine gute Korrelation zwischen den Volumina, die mit MRT und Schieblehre gemessen werden, besteht [SILVEIRA et al., 2013]. Vorteil dieser Untersuchungsmethode ist die qualitativ hochwertige Bildgebung mit hohem Weichteilkontrast und räumlicher Auflösung [BROCKMANN et al., 2007]. Teilweise können hierzu neuere klinische Geräte verwendet werden, die mit speziellen Spulen ausgestattet sind. Zur detaillierten Untersuchung pathologischer Prozesse wie Entzündungen, Organperfusion oder Zellmigration werden jedoch spezielle Kleintier-MRT's mit einer hohen Feldstärke von bis zu 17,6 Tesla benötigt. Die erzeugten Bilder zeichnen sich durch hohe Empfindlichkeit aus, wobei mit zunehmenden Feldstärken häufig Artefakte auftreten können [DE KEMP et al., 2010]. Limitierend für die MRT-Bildgebung sind jedoch die hohen Anschaffungskosten für die Geräte sowie die teilweise langen Untersuchungszeiten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der hochauflösenden Ultraschallbildgebung zur nicht-invasiven, repetitiven Analyse induzierter Endometrioseherde angewendet [LASCHKE et al., 2010]. Die eindeutigen Vorteile der Sonographie liegen in der hohen räumlichen Auflösung, dem Gewebekontrast auch ohne die Verwendung von Kontrastmitteln sowie der schnellen und einfachen Handhabung [BECKMANN et al., 2007]. Die Ultraschalltechnik wurde bislang sehr effektiv in der Erforschung von Tumorerkrankungen und der präklinischen Entwicklung von neuen Medikamenten eingesetzt. Studien haben gezeigt, dass die dreidimensionale Bildgebung von Prostatatumoren im Mausmodell eine 100%ige Wiederfindungsrate der Tumore auch in der frühen Phase des Wachstums ermöglicht [WIRTZFELD et al., 2005]. Weiterhin konnte die Progression des Gewebes während der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden. Hierbei ergab sich eine sehr gute Korrelation zwischen zwei- und dreidimensionaler Volumenmessung [CHEUNG et al., 2005] sowie im Vergleich mit der histomorphometrischen Auswertung von Gewebeschnitten [JOUANNOT et al., 2006]. Somit kann diese bildgebende Technik zur Visualisierung und Quantifizierung von Gewebewachstum eingesetzt werden und stellt ein zuverlässiges System zur Verlaufsbeobachtung medikamentöser Therapien dar [WEISSLEDER, 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Analyse des Größenwachstums Xanthohumol- und Resveratrol-behandelter Endometrioseherde ein hochauflösendes Ultraschallgerät verwendet. Hierbei kam ein 40 MHz Ultraschallkopf mit einer Auflösung von 30  $\mu\text{m}$  und einer Fokustiefe von 6 mm zum Einsatz. Zur Untersuchung wurden die an der Bauchwand angenäherten Endometrioseherde herangezogen, da diese nicht wie die mesenterialen Herde der Peristaltik des Darmes unterworfen waren. Allerdings kann das Wachstum der Transplantate durch das verwendete Nahtmaterial beeinflusst werden. Durch die Induktion von Endometrioseherden durch intraperitoneale Injektion von Gewebefragmenten [HIRATA et al., 2005; NOWAK et al., 2008] kann eine solche Fremdkörperreaktion vermieden werden. Jedoch sind auf diese Weise induzierte Endometrioseherde bei der Ultraschallbildgebung durch ihre nicht definierte Lokalisation sehr schwer wieder aufzufinden.

In einer vorhergehenden Studie konnte bereits gezeigt werden, dass durch hochauflösende Ultraschallbildgebung eine nichtinvasive, repetitive Analyse des Stromawachstums und der Zystenbildung in sich entwickelnden peritonealen Endometrioseherden möglich ist [LASCHKE et al., 2010]. Dabei ist eine Unterscheidung der beiden zellulären Kompartimente über einen Zeitverlauf von 28 Tagen sehr gut möglich. Die Messung von Zysten- und Stromavolumen und die daraus resultierenden Wachstumsraten zeigten, dass die initiale Entwicklung der Herde durch eine verstärkte Zellproliferation ausgelöst wird. Im späteren Verlauf ist die Größenzunahme der Herde durch die Entwicklung großvolumiger Zysten gekennzeichnet. In Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien zur ultraschallbasierten Analyse von Tumorgewebe konnten die Autoren auch hier eine gute Korrelation zwischen den Ultraschallergebnissen, Schieblehrenmessungen und Histomorphometrie zeigen.

Demzufolge ermöglicht diese Untersuchungsmethode eine nicht-invasive, morphologische Bildgebung in Echtzeit, die im Vergleich zu anderen Verfahren relativ kostengünstig und weniger zeitintensiv ist. Zudem stellt die kurze Aquisitionszeit der Daten eine geringere Belastung für das Versuchstier dar. Die Möglichkeit, Endometrioseherde wiederholt in Verlaufsstudien zu analysieren, reduziert die Anzahl der Versuchstiere, da diese zur Datenerhebung nicht mehr zu den unterschiedlichen Zeitpunkten getötet werden müssen.

## 7.2. Diskussion der Ergebnisse

### 7.2.1. Xanthohumol

Xanthohumol stellt mit 82-89% den Hauptbestandteil der prenylierten Flavonoide im Hopfen dar [ALBINI et al., 2006]. Als pleiotrope Substanz entfaltet Xanthohumol ein breites Wirkungsspektrum und beeinflusst *in vitro* und *in vivo* eine Vielzahl molekularer Signalwege in verschiedenen Tumorzelllinien [MIRANDA et al., 1999; DELL'ÉVA et al., 2007; MONTEIRO et al., 2008]. Die anti-proliferativen, anti-inflammatorischen und anti-angiogenen Eigenschaften von Xanthohumol lassen darauf schließen, dass die Substanz zur Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen eingesetzt werden kann [STEVENS und PAGE, 2004]. Neben den genannten Effekten wirkt Xanthohumol auch als Aromatase-Inhibitor und nimmt somit Einfluss auf die Östrogen-Synthese [MONTEIRO et al., 2006]. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte der Einsatz von Xanthohumol eine vielversprechende Behandlungsstrategie zur Therapie Östrogen-abhängiger Erkrankungen und somit auch der Endometriose darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Xanthohumol die Entwicklung von Endometrioseherden inhibiert [RUDZITIS-AUTH et al., 2012]. Diese Hemmung führt zu einer Regression der Endometrioseherde durch die Inhibition der Zellproliferation und Angiogenese. In der durchgeführten Studie wurde eine Xanthohumol-Dosierung verwendet, die bereits in anderen *in vivo* Experimenten zu einem verminderten Tumorwachstum durch Inhibition der Vaskularisierung führte [MONTEIRO et al., 2008]. Da die Bioverfügbarkeit von Xanthohumol generell sehr niedrig ist [LEGETTE et al., 2012], wird die Gabe von 100 mM Xanthohumol (~8 mg/kg) zu keinen relevanten Plasmaspiegeln führen. In pharmakokinetischen Tierstudien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Xanthohumol nicht-enzymatisch zu Iso-Xanthohumol und enzymatisch zu 6- und 8-Prenylnaringenin konvertiert wird. Die Umwandlung von Iso-Xanthohumol zu 8-Prenylnaringenin, dem bislang potentesten Phytoöstrogen, wird hepatisch über Cytochrom1A2 [GUO et al., 2006] oder durch die Darmflora katalysiert [POSSEMIERS et al., 2006]. Es ist daher anzunehmen, dass der inhibitorische Effekt von Xanthohumol auch durch seine Metaboliten vermittelt wird. Diese Erkenntnisse sowie die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass auch niedrige Konzentrationen von Xanthohumol relevante biologische Effekte ausüben und deshalb gegen Krebs oder Endometriose eingesetzt werden können.

Der Einsatz von anti-angiogenen Substanzen zur Behandlung der Endometriose wird in den letzten Jahren vermehrt diskutiert [LASCHKE et al., 2006a; 2006b; BECKER und D'AMATO, 2007; LASCHKE et al., 2007; LASCHKE und MENDER, 2007]. In vorausgehenden Studien wurde bereits eine anti-angiogene Wirkung von Xanthohumol beschrieben. Es ist bekannt, dass Xanthohumol die Expression von VEGF-A reduziert und somit zu einer verminderten Blutgefäßdichte in Brustkrebs-



Xenotransplantaten und bei Wundheilungsmodellen führt [MONTEIRO et al., 2008; NEGRAŐ et al., 2012]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die Proliferation endothelialer Zellen hemmt, wobei durch die Inhibition der Serin/Threonin-Kinase AKT eine Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung erfolgt [ALBINI et al., 2006]. In Übereinstimmung mit diesen Studien konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Xanthohumol einen direkten anti-proliferativen Effekt auf die Endothelzellen der Blutgefäße in Endometrioseherden ausübt. Infolge dessen war die Kapillardichte der Herde signifikant reduziert. Dabei kam es allerdings nicht zu einer Induktion von Apoptose. Vielmehr kann diese Wirkung durch die bereits beschriebene direkte Hemmung des VEGF-Signalweges erklärt werden [DELL'EVA et al., 2007; NEGRAŐ et al., 2012].

*In vitro* Analysen belegen, dass Endometrioseherde oxidativem Stress ausgesetzt ist. Die durch die Zunahme der ROS-Produktion ausgelöste Fehlregulation von Signalwegen der ROS-Detoxifikation resultiert in einer gesteigerten Zellproliferation durch die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 [NGŐ et al., 2009]. Als weiterer Wirkmechanismus konnte nachgewiesen werden, dass Xanthohumol in höheren Konzentrationen die Bildung von Superoxid-Anion-Radikalen anregt. Diese führen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und leiten damit den apoptotischen Zelltod ein [STRATHMANN et al., 2010]. Allerdings konnte dieser Einfluss von Xanthohumol im vorliegenden Modell ausgeschlossen werden, da in den immunhistochemischen Analysen keine apoptotischen Zellen nachgewiesen wurden. Andererseits gilt Xanthohumol als Antioxidanz und ist in der Lage, ROS wie Hydroxyl- und Peroxyl-Radikale abzufangen [GERHAUSER et al., 2002]. Zudem fördert oxidativer Stress die Expression von VEGF und begünstigt dadurch die Vaskularisierung des ektopen Gewebes [PARK et al., 2006; TAYLOR et al., 2009]. Somit könnte der anti-oxidative Effekt von Xanthohumol zusätzlich die Regression von Endometrioseherden fördern.

In Anbetracht der Tatsache, dass das Überleben und die Proliferation des Endometriosegewebes wesentlich von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen abhängig ist [GROOTHUIS et al., 2005; LASCHKE und MENGER, 2007], könnte der beobachtete anti-angiogene Effekt von Xanthohumol eine Erklärung für die reduzierte Zellproliferation in den Endometrioseherden sein. Weiterhin könnte die anti-proliferative Wirkung von Xanthohumol durch einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus ausgelöst werden. Dabei kommt es zur Induktion eines Zellzyklusarrestes während der S- und G2/M-Phase oder zu einer Inhibition der p21-Expression und cdc2-Phosphorylierung [DRENZEK et al., 2001]. Eine proliferationshemmende Wirkung könnte auch durch das anti-östrogene Potential der Substanz ausgelöst werden [GERHAUSER et al., 2002]. Obwohl Xanthohumol selbst keine östrogene Aktivität entfaltet, wird nach Verabreichung der Substanz die Östrogensynthese durch Inhibition der Aromatase gehemmt. Östrogen stimuliert die Proliferation von Endometrium durch eine Aktivierung

des PI3-K-Signalweges über eine NF- $\kappa$ B- vermittelte Inhibition der Phosphatase PTEN [ZHANG et al., 2010]. Durch die Inhibition der Aromatase oder durch Bindung an den Östrogenrezeptor könnte Xanthohumol über diesen Mechanismus die PI-3K-Expression reduzieren und damit zu anti-proliferativen Effekten führen. Für diese Hypothese sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Western Blot-Analyse. Dabei konnte gezeigt werden, dass Xanthohumol die PI3-K-Expression hemmt, die pErk1/2-Expression aber nicht beeinflusst.

Das klinische Bild der Endometriose ist gekennzeichnet durch eine sehr variable Verteilung von Endometrioseherden innerhalb des Bauchraums. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Effekt von Xanthohumol auf Endometrioseherde an verschiedenen Transplantationsstellen, wie der lateralen Bauchwand und dem Mesenterium, untersucht. Im Gegensatz zu mesenterialen Herden, können peritoneale Herde sehr gut mittels hochauflösender Ultraschallbildgebung detektiert werden, da diese nicht durch Atembewegungen und Darmperistaltik in ihrer Lokalisation beeinflusst werden. Die Analyse der Ultraschallbilder zeigte, dass die Behandlung mit Xanthohumol neben der Proliferation des Stromagewebes auch die Entwicklung großvolumiger Zysten in Endometrioseherden hemmt. Ein Auslöser dafür könnte die Reduktion der sekretorischen Aktivität des glandulären Epithels sein. In Übereinstimmung mit vorausgehenden Studien [STOECKEMANN et al., 1995] konnte gezeigt werden, dass an Tag 28 mesenteriale Herde im Vergleich zu peritonealen Herden größer sind. Dies könnte insbesondere durch die bessere Blutversorgung der Herde durch die Mesenterialgefäße verursacht werden. Trotzdem konnte zwischen peritonealen und mesenterialen Herden innerhalb einer Behandlungsgruppe kein erkennbarer Unterschied bei der Größenentwicklung der Herde beobachtet werden. Die Ultraschall-Ergebnisse wurden durch die Messung mittels digitalem Messschieber bestätigt. Daher kann man davon ausgehen, dass sich ein Behandlungserfolg unter Xanthohumol-Gabe unabhängig von der Lokalisation der Endometrioseherde im Bauchraum einstellt.

Um Nebenwirkungen auf die Reproduktionsorgane auszuschließen wurde zusätzlich zu der Analyse der Endometrioseherde der Effekt von Xanthohumol auf den Uterus und die Ovarien untersucht. Da im adulten Organismus Angiogenese ausschließlich während der Embryonalentwicklung, der Wundheilung sowie während des Menstruationszyklus vorkommt [REYNOLDS et al., 1991, 2002], sind unerwünschte Effekte auf den weiblichen Reproduktionstrakt durch Angiogenese-Inhibitoren nicht unwahrscheinlich. Interessanterweise zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass Xanthohumol keinen Einfluss auf die Morphologie, Vaskularisierung und Zellproliferation im Uterus und im Ovar ausübt. Daher kann man annehmen, dass Xanthohumol selektiv auf Endometrioseherde wirkt. Dieses Ergebnis stimmt mit denen einer Studie von HUSSONG et al. [2005] überein. In dieser Studie wurde die Sicherheit von oralen Xanthohumol-Dosierungen bis zu 1000 mg/kg in Ratten untersucht und

weder ein negativer Effekt auf die Fertilität noch auf die Entwicklung der Nachkommen nachgewiesen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Xanthohumol die Entwicklung von Endometrioseherden hemmt. Die Verabreichung des Wirkstoffes resultiert in einer Inhibition der Proliferation des Endometriums sowie der darin befindlichen Endothelzellen und vermindert dadurch die Bildung neuer Blutgefäße in den Herden. Somit stellt die Applikation von Xanthohumol einen neuen therapeutischen Ansatz zur Therapie der Endometriose dar.

### **7.2.2. Resveratrol**

Resveratrol kommt als Pflanzeninhaltsstoff in verschiedenen Lebensmitteln wie Weintrauben, roten Beeren und Nüssen vor. Auf Grund seiner vielfältigen Wirkungsweisen ist das Stilbenderivat eine der in den letzten Jahren am häufigsten untersuchten Phytosubstanzen im Bereich der Medizin und Biowissenschaften. Neben kardio- und neuroprotektiven Effekten wird Resveratrol eine Reihe weiterer gesundheitsfördernder und präventiver Eigenschaften bei einer Vielzahl von Erkrankungen zugeschrieben. Hierzu zählen Stoffwechselerkrankungen [BEAUDEUX et al., 2010], Auto-Immunerkrankungen [BAUR und SINCLAIR, 2006], Arthritis [ELMALI et al., 2007], Atemwegserkrankungen [ICHIKAWA et al., 2013] und Krebs [ALUYEN et al., 2012]. Demnach wirkt Resveratrol anti-inflammatorisch, anti-oxidativ, pro-apoptotisch und anti-östrogen und wird als erfolgversprechendes Mittel zur Therapie von Tumorerkrankungen angesehen [BAUR und SINCLAIR, 2006].

In einer kürzlich veröffentlichten Studie berichtete BRUNER-TRAN et al. [2011], dass Resveratrol auch zur Prävention und Therapie der Endometriose geeignet sein könnte. In dieser Studie konnten die Autoren zeigen, dass die Behandlung mit Resveratrol das Anwachsen von Endometrioseherden hemmt und gleichzeitig das Wachstum und damit die Größe der etablierten Herde reduziert. Als möglicher Wirkmechanismus wurde hierbei der pro-apoptotische Effekt der Substanz in den Vordergrund gestellt. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die anti-angiogene Aktivität von Resveratrol ebenfalls zur Inhibition des Wachstums von Endometrioseherden beiträgt [RUDZITIS-AUTH et al., 2013]. Die hierzu eingesetzte perorale Applikation von 40 mg/kg Resveratrol erwies sich bereits in vorhergehenden Tumor-Studien als effektive anti-angiogene Dosierung [TSENG et al., 2004; HARIKUMAR et al., 2010].

Als pleiotrope Substanz wirkt Resveratrol auf wesentliche Mechanismen des angiogenen Prozesses ein [CHEN and TSENG, 2007]. *In vitro* und *in vivo* inhibiert Resveratrol die Expression von HIF-1 $\alpha$  und VEGF durch die Hypoxie-vermittelte Aktivierung von Erk1/2 und AKT [CAO et al., 2004; TSENG et al., 2004; ZHANG et al., 2005]. Weiterhin reduziert die Substanz die Aktivität von MMP-2 und -9

[GANAPATHY et al., 2010], die während der Angiogenese die extrazelluläre Matrix des vorhandenen Gefäßes abbauen, sodass die Bildung von Kapillarsprossen durch Migration der Endothelzellen ermöglicht wird [CARMELIET, 2000]. Ein weiterer Effekt ist die direkte Hemmung der Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen [HU et al., 2007; LEE et al., 2009]. Dies wird durch die Reduktion der VEGF- und bFGF-Expression und der Aktivität von Erk1/2 und NF- $\kappa$ B vermittelt. In Übereinstimmung mit diesen Studien konnte hier nachgewiesen werden, dass die Behandlung peritonealer und mesenterialer Endometrioseherde mit Resveratrol in einer Reduktion der Kapillardichte resultiert. Detaillierte Untersuchungen zeigen, dass dies durch eine verminderte Proliferationsaktivität der Endothelzellen in den neugebildeten Mikrogefäßen der Herde verursacht wird.

Zur nicht-invasiven repetitiven Beurteilung peritonealer Endometrioseherde wurde die hochauflösende Ultraschallbildgebung eingesetzt. Dieser Ansatz ermöglichte die Unterscheidung zwischen proliferierendem Stroma und Zysten während des gesamten Untersuchungszeitraums. Dies ist ein wesentlicher Vorteil dieser Technik, da beide Kompartimente zu der Größenentwicklung der Herde beitragen [LASCHKE et al., 2010]. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Resveratrol sowohl die sekretorische Aktivität der glandulären Zellen als auch die Proliferation der Stromazellen hemmt. Dies resultiert in verminderten Zystenvolumina und einer Regression des Stromagewebes. Weitere histomorphometrische Untersuchungen sowie der Vergleich mit den Messschieber-Daten bestätigten diese Beobachtung. Die histomorphometrische Analyse zeigte ähnlich wie die ultraschallbasierte Analyse, dass das Volumen des Stromagewebes in der Behandlungsgruppe reduziert war. Allerdings wurden die aus den Histologieschnitten berechneten Volumina im Vergleich zu den Ultraschalldaten deutlich unterschätzt, was auf die Schrumpfung des Gewebes während des Fixationsprozesses zurückzuführen ist.

Die Regression des Stromagewebes könnte durch vermehrte Apoptose ausgelöst werden. Dies wurde in der Studie von BRUNER-TRAN et al. [2011] in transplantiertem humanen Endometrium mittels TUNEL-Assay gezeigt. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte dieser Mechanismus jedoch nicht bestätigt werden. In den Endometrioseherden konnten keine Casp-3-positiven Zellen nachgewiesen werden. Dieses abweichende Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass in beiden Studien unterschiedliche Gewebetypen transplantiert wurden. So wurden in der vorliegenden Arbeit Endometrioseherde durch die Transplantation von murinem Gewebe eines Spendertieres induziert. Dies ist auch der Grund dafür, dass die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse nicht vollständig auf die Pathogenese der Endometriose in humanen Patientinnen mit Endometriose übertragen werden können. Je nach Art und Ausmaß eines Stimulus reagieren verschiedene Zellen unterschiedlich. Dabei kann entweder die Apoptose eingeleitet oder durch Absterben und Zerfall der Zellen Nekrose auslöst

werden [ELMORE, 2007]. Bei der Verabreichung von zytotoxischen Substanzen ist die Wahl der Dosierung von Bedeutung. Geringe Dosen können dabei Apoptose auslösen, wobei dieselbe Substanz in hohen Dosen zur Nekrose führt. Der Nachweis von Casp-3 gilt als spezifischer Marker für die Phase der frühen Apoptose, wohingegen der TUNEL-Assay auf die späte Phase fokussiert. Caspasen werden jedoch häufig nur vorübergehend exprimiert. Da die Zeitdauer von der Initiation der Apoptose bis zum Zelltod lediglich ca. 2-3 Stunden betragen kann, können in Langzeitstudien damit auch falsch negative Ergebnisse ermittelt werden. Die Grundlage des TUNEL-Assays ist der Nachweis der DNA-Fragmentierung. Dies ist auch bei nekrotischen Zellen, DNA-Reparatur und Gentranskription der Fall, sodass diese Methode auch zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Zusätzlich ist bekannt, dass Resveratrol einen dosisabhängigen Effekt auf die Induktion der Apoptose ausübt [MUKHERJEE et al., 2010]. In der durchgeführten Studie wurden die Tiere mit einer 8-fach niedrigeren Dosis behandelt als in der vorhergehenden Studie von BRUNER-TRAN et al. [2011]. Daher ist es möglich, dass die hier eingesetzte Dosierung nicht ausreichend hoch war, um Apoptose zu induzieren. Darüber hinaus könnte die Apoptose auch über einen Caspase-unabhängigen mitochondrialen Weg eingeleitet werden. Dabei kommt es zu einer mitochondrialen Freisetzung von Apoptosis-inducing Factor (AIF) und Endonuclease G. Die nachfolgenden Translokation von AIF vom Zytosol in den Zellkern resultiert in einer DNA-Fragmentierung welche die Apoptose auslöst [ZHANG et al., 2011]. Besonders zu erwähnen ist jedoch, dass die hier verwendete Dosierung von 40 mg/kg nach der Umrechnungsformel von REAGAN-SHAW et al. [2008] einer humanen Dosis von ca. 230 mg für einen Menschen von 70 kg entspricht und damit einer klinisch niedrigen Dosierung [SMOLIGA et al., 2011; SCOTT et al., 2012].

In weiteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferationsfähigkeit stromaler und glandulärer Zellen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Resveratrol die Proliferation beider Zelltypen sowohl in peritonealen als auch mesenterialen Zellen hemmt. Allerdings stimmen die ermittelten Daten der PCNA- und Ki67-Färbungen nicht gut überein. Wie erwartet, war die Anzahl der Ki67-positiven Zellen in Endometrioseherden im Allgemeinen geringer als die der PCNA-positiven Zellen, da Ki67 ein spezifischerer Marker für die Zellproliferation ist [KORDEK et al., 1996]. Darüber hinaus wurden signifikante Unterschiede in der proliferativen Aktivität von Stromazellen in PCNA-gefärbten Herden gefunden. Die Ki67-Expression hingegen war hauptsächlich in glandulären Zellen unterschiedlich. Dies könnte durch die lange Halbwertszeit von PCNA erklärt werden [YU et al., 1992]. Diese beträgt ca. 20 Stunden, sodass PCNA auch in Zellen, die schon den Zellzyklus verlassen haben, nachgewiesen werden kann. Des Weiteren stabilisieren autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren die PCNA mRNA. Infolge dessen kann das Protein auch in nicht proliferierenden Zellen akkumulieren [HALL et al., 1990]. Zusätzlich belegen vorhergehende Studien, dass PCNA in Zellen nicht nur an der DNA-Synthese beteiligt ist, sondern vielmehr auch an Reparaturmechanismen

nach DNA-Schädigung [GRAMANTIERI et al., 2003]. Trotz dieser Unterschiede zwischen den PCNA- und Ki67-Analysen weisen jedoch beide Marker auf einen inhibitorischen Effekt von Resveratrol auf Endometrioseherde hin.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Resveratrol die Entwicklung neuer Blutgefäße in Endometrioseherden durch Inhibition der endothelialen Zellproliferation unterdrückt. Dies führt zu einem verminderten Größenwachstum der Herde. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die Ausbildung und die Progression einer Endometriose wesentlich von angiogenen Prozessen abhängt [FENG et al., 2012]. Entsprechend sollten weiterführende Studien klären, ob die beobachteten positiven Wirkungen von Resveratrol auch unter klinischen Bedingungen ohne substantielle Nebenwirkungen für Endometriosepatientinnen reproduzierbar sind.

### **7.3. Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass die Pflanzeninhaltsstoffe Xanthohumol und Resveratrol die Vaskularisierung experimentell induzierter Endometrioseherde signifikant inhibieren. Mit Hilfe der verwendeten nicht-invasiven, hochauflösenden Ultraschallbildgebung konnte das Wachstum der Endometrioseherde repetitiv beobachtet und quantitativ analysiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Phytochemikalien eine vielversprechende anti-angiogene Therapieoption zur Behandlung der Endometriose darstellt. Es müssen jedoch im Rahmen von weiteren Studien Untersuchungen zur Dosierung, Sicherheit und Wirksamkeit der Substanzen erfolgen. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund wichtig, dass eine Behandlung der Endometriose meist über einen längeren Zeitraum erfolgt und beide Pflanzeninhaltsstoffe entweder direkt oder durch ihre Metabolite als Phytoöstrogene wirken. Da sowohl Resveratrol als auch Xanthohumol pleiotrop wirken und eine Vielzahl von molekularen Signalwegen beeinflussen, ist eine weitergehende Analyse ihres Wirkungsspektrums bei Endometriose von großer Relevanz. Des Weiteren könnte auch die Untersuchung von Analoga oder Derivaten der Substanzen im Hinblick auf die Entwicklung von Medikamenten von großem Interesse sein.

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Absenger Y, Hess-Stumpp H, Kreft B, Krätzschar J, Haendler B, Schütze N, Regidor PA, Winterhager E (2004)** Cyr61, a deregulated gene in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 10:399-407
2. **Adamson GD (2011)** Endometriosis classification: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 23:213-220
3. **Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y (2004)** Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24:2783-2840
4. **Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, Mukhtar H (2001)** Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res* 7:1466-1473
5. **Albini A, Dell'Eva R, Vené R, Ferrari N, Buhler DR, Noonan DM, Fassina G (2006)** Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. *FASEB J* 20:527-529
6. **Algire GH (1943)** An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4:1-11
7. **Al-Talib A, Tulandi T (2010)** Intestinal endometriosis. *Gynecol Surg* 7:61-62
8. **Aluyen JK, Ton QN, Tran T, Yang AE, Gottlieb HB, Bellanger RA (2012)** Resveratrol: potential as anticancer agent. *J Diet Suppl* 9:45-56
9. **Arfors KE, Jonsson JA, McKenzie FN (1970)** A titanium rabbit ear chamber: assembly, insertion and results. *Microvasc Res* 2:516-518
10. **Arici A, Tazuke SI, Attar E, Kliman HJ, Olive DL (1996)** Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod* 2:40-45
11. **Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL (2009)** Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 486:95-102
12. **Augoulea A, Alexandrou A, Creatsa M, Vrachnis N, Lambrinoudaki I (2012)** Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet* 286:99-103

13. **Avula B, Ganzera M, Warnick JE, Feltenstein MW, Sufka KJ, Khan IA (2004)** High-performance liquid chromatographic determination of xanthohumol in rat plasma, urine, and fecal samples. *J Chromatogr Sci* 42:378-382
14. **Badawy SZ, Cuenca V, Kaufman L, Stitzel A, Thompson M (1989)** The regulation of immunoglobulin production by B cells in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 51:770-773
15. **Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB (2002)** Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res* 62:4945-4954
16. **Baur JA, Sinclair DA (2006)** Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493-506
17. **Beaudeau JL, Nivet-Antoine V, Giral P (2010)** Resveratrol: a relevant pharmacological approach for the treatment of metabolic syndrome? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:729-736
18. **Becker CM, Sampson DA, Rupnick MA, Rohan RM, Efstathiou JA, Short SM, Taylor GA, Folkman J, D'Amato RJ (2005)** Endostatin inhibits the growth of endometriotic lesions but does not affect fertility. *Fertil Steril* 84 Suppl 2:1144-1155
19. **Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, Funakoshi T, Folkman J, Kung AL, D'Amato RJ (2006)** A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol* 168:2074-2084
20. **Becker CM, D'Amato RJ (2007)** Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. *Microvasc Res* 74:121-130
21. **Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, Folkman J, D'Amato RJ (2008)** 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1{alpha} and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 172:534-544
22. **Beckman EN, Pintado SO, Leonard GL, Sternberg WH (1985)** Endometriosis of the prostate. *Am J Surg Pathol* 9:374-379
23. **Beckmann N, Kneuer R, Gremlich HU, Karmouty-Quintana H, Blé FX, Müller M (2007)** In vivo mouse imaging and spectroscopy in drug discovery. *NMR Biomed* 20:154-185
24. **Benagiano G, Brosens I (2006)** History of adenomyosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 20:449-463



25. **Benelli R, Venè R, Ciarlo M, Carlone S, Barbieri O, Ferrari N (2012)** The AKT/NF- $\kappa$ B inhibitor xanthohumol is a potent anti-lymphocytic leukemia drug overcoming chemoresistance and cell infiltration. *Biochem Pharmacol* 83:1634-1642
26. **Berkkanoglu M, Arici A (2003)** Immunology and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 50:48-59
27. **Bråkenhielm E, Cao R, Cao Y (2001)** Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *FASEB J* 15:1798-1800
28. **Brockmann MA, Kemmling A, Groden C (2007)** Current issues and perspectives in small rodent magnetic resonance imaging using clinical MRI scanners. *Methods* 43:79-87
29. **Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG (1997)** Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 99:2851-2857
30. **Bruner-Tran KL, Osteen KG, Duleba AJ (2009)** Simvastatin protects against the development of endometriosis in a nude mouse model. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2489-2494
31. **Bruner-Tran KL, Osteen KG, Taylor HS, Sokalska A, Haines K, Duleba AJ (2011)** Resveratrol inhibits development of experimental endometriosis in vivo and reduces endometrial stromal cell invasiveness in vitro. *Biol Reprod* 84:106-112
32. **Bulun SE, Fang Z, Imir G, Gurates B, Tamura M, Yilmaz B, Langoi D, Amin S, Yang S, Deb S (2004)** Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 22:45-50
33. **Burney RO, Giudice LC (2012)** Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 98:511-519
34. **Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012)** Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 7:e35538
35. **Cao Z, Fang J, Xia C, Shi X, Jiang BH (2004)** trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 10:5253-5263
36. **Careri M, Corradini C, Elviri L, Nicoletti I, Zagnoni I (2004)** Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of cis-resveratrol and trans-resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts. *J Agric Food Chem* 52:6868-6874
37. **Carmeliet P (2000)** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395

38. Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciag A, Puca AA, Vecchione C (2013) Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol* 61:215-226
39. Chen MC, Chang WW, Kuan YD, Lin ST, Hsu HC, Lee CH (2012) Resveratrol inhibits LPS-induced epithelial-mesenchymal transition in mouse melanoma model. *Innate Immun* 18:685-693
40. Chen Y, Tseng SH (2007) Review. Pro- and anti-angiogenesis effects of resveratrol. *In Vivo* 21:365-370
41. Cheung AM, Brown AS, Hastie LA, Cucevic V, Roy M, Lacefield JC, Fenster A, Foster FS (2005) Three-dimensional ultrasound biomicroscopy for xenograft growth analysis. *Ultrasound Med Biol* 31:865-870
42. Cho YC, You SK, Kim HJ, Cho CW, Lee IS, Kang BY (2010) Xanthohumol inhibits IL-12 production and reduces chronic allergic contact dermatitis. *Int Immunopharmacol* 10:556-561
43. Cook MR, Luo J, Ndiaye M, Chen H, Kunnimalaiyaan M (2010) Xanthohumol inhibits the neuroendocrine transcription factor achaete-scute complex-like 1, suppresses proliferation, and induces phosphorylated ERK1/2 in medullary thyroid cancer. *Am J Surg* 199:315-318
44. Cramer DW, Missmer SA (2002) The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955:11-22
45. Crosignani P, Olive D, Bergqvist A, Luciano A (2006) Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians. *Hum Reprod Update* 12:179-189
46. Cummings AM, Metcalf JL (1995) Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol* 9:233-238
47. Deeb D, Gao X, Jiang H, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC (2010) Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of xanthohumol, a prenylated chalone present in hops, in human prostate cancer cells. *Anticancer Res* 30:3333-3339
48. de Kemp RA, Epstein FH, Catana C, Tsui BM, Ritman EL (2010) Small-animal molecular imaging methods. *J Nucl Med* 51 Suppl 1:18S-32S
49. de la Lastra CA, Villegas I (2007) Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 35:1156-1160
50. Delgado-Rosas F, Gómez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simón C, Pellicer A (2011) The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction* 142:745-755

51. **Dalsgaard T, Hjordt Hansen MV, Hartwell D, Lidegaard O (2013)** Reproductive prognosis in daughters of women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 28:2284-2288
52. **Dell'Eva R, Ambrosini C, Vannini N, Piaggio G, Albini A, Ferrari N (2007)** AKT/NF-kappaB inhibitor xanthohumol targets cell growth and angiogenesis in hematologic malignancies. *Cancer* 110:2007-2011
53. **Delmas D, Lançon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N (2006)** Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr Drug Targets* 7:423-442
54. **Delmulle L, Bellahcène A, Dhooge W, Comhaire F, Roelens F, Huvaere K, Heyerick A, Castronovo V, De Keukeleire D (2006)** Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine* 13:732-734
55. **Di Carlo C, Bonifacio M, Tommaselli GA, Bifulco G, Guerra G, Nappi C (2009)** Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril* 91:2315-2323
56. **Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M (1998)** Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 13:1686-1690
57. **Dorn C, Kraus B, Motyl M, Weiss TS, Gehrig M, Schölmerich J, Heilmann J, Hellerbrand C (2010)** Xanthohumol, a chalcon derived from hops, inhibits hepatic inflammation and fibrosis. *Mol Nutr Food Res* 54:S205-S213
58. **Dorn C, Massinger S, Wuzik A, Heilmann J, Hellerbrand C (2013)** Xanthohumol suppresses inflammatory response to warm ischemia-reperfusion induced liver injury. *Exp Mol Pathol* 94:10-16
59. **Drenkhahn M, Gescher DM, Wolber EM, Meyhoefer-Malik A, Malik E (2004)** Expression of angiopoietin 1 and 2 in ectopic endometrium on the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril* 81 Suppl 1:869-875
60. **Drenzek JG, Seiler NL, Jaskula-Sztul R, Rausch MM, Rose SL (2011)** Xanthohumol decreases Notch1 expression and cell growth by cell cycle arrest and induction of apoptosis in epithelial ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 122:396-401
61. **Ebert AD (2010)** Endometriose - Ein Wegweiser für die Praxis. 3. überarbeitete Auflage. Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York
62. **Eggermont J, Donnez J, Casanas-Roux F, Scholtes H, Van Langendonck A (2005)** Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertil Steril* 84:492-499

63. **Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B (2007)** Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation* 3:1-6
64. **Elmore S (2007)** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516
65. **Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K (1980)** Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 177:125-134
66. **Esfandiari N, Khazaei M, Ai J, Bielecki R, Gotlieb L, Ryan E, Casper RF (2007)** Effect of a statin on an in vitro model of endometriosis. *Fertil Steril* 87:257-262
67. **Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Aggarwal BB (2003)** Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood* 102:987-995
68. **Fakih H, Baggett B, Holtz G, Tsang KY, Lee JC, Williamson HO (1997)** Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 47:213-217
69. **Fedele L, Bianchi S, Di Nola G, Candiani M, Busacca M, Vignali M (1994)** The recurrence of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 734:358-364
70. **Fedele L, Bianchi S, Zanconato G, Portuese A, Raffaelli R (2001)** Use of the levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril* 75:485-488
71. **Feng D, Welker S, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Menger MD, Montenarh M, Laschke MW (2012)** Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions. *Angiogenesis* 15:243-252
72. **Fernández-Shaw S, Hicks BR, Yudkin PL, Kennedy S, Barlow DH, Starkey PM (1993)** Anti-endometrial and anti-endothelial auto-antibodies in women with endometriosis. *Hum Reprod* 8:310-315
73. **Ferriani RA, Charnock-Jones DS, Prentice A, Thomas EJ, Smith SK (1993)** Immunohistochemical localization of acid and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis and the detection of their mRNA by polymerase chain reaction. *Hum Reprod* 8:11-16
74. **Floyd WS (1980)** Danazol: endocrine and endometrial effects. *Int J Fertil* 25:75-80
75. **Folkman J (1984)** What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51:601-604

76. **Folkman J (1995)** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31
77. **Galle PC (1989)** Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 16:29-42
78. **Ganapathy S, Chen Q, Singh KP, Shankar S, Srivastava RK (2010)** Resveratrol enhances antitumor activity of TRAIL in prostate cancer xenografts through activation of FOXO transcription factor. *PLoS One* 5:e15627
79. **Gao X, Outley J, Botteman M, Spalding J, Simon JA, Pashos CL (2006)** Economic burden of endometriosis. *Fertil Steril* 86:1561-1572
80. **Gerhäuser C (2005)** Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* 41:1941-1954
81. **Gerhauser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauf J, Neumann I, Scherf HR, Frank N, Bartsch H, Becker H (2002)** Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* 1:959-969
82. **Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, Korzeniewski K, Patnaik P, Marumganti A, Chaudhuri A, Dandona P (2010)** An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing Resveratrol. *J Clin Endocrinol Metab* 95:E1-E8
83. **Giannarini G, Scott CA, Moro U, Grossetti B, Pomara G, Selli C (2006)** Cystic endometriosis of the epididymis. *Urology* 68:203.e1-3
84. **Giudice LC (2010)** Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 362:2389-2398
85. **Gleicher N, el-Roeiy A, Confino E, Friberg J (1987)** Is endometriosis an autoimmune disease? *Obstet Gynecol* 70:115-122
86. **Goteri G, Lucarini G, Montik N, Zizzi A, Stramazzotti D, Fabris G, Tranquilli AL, Ciavattini A (2009)** Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha), and microvessel density in endometrial tissue in women with adenomyosis. *Int J Gynecol Pathol* 28:157-163
87. **Goto K, Asai T, Hara S, Namatame I, Tomoda H, Ikemoto M, Oku N (2005)** Enhanced antitumor activity of xanthohumol, a diacylglycerol acyltransferase inhibitor, under hypoxia. *Cancer Lett* 219:215-222

88. **Gramantieri L, Trere` D, Chieco P, Lacchini M, Giovannini C, Piscaglia F, Cavallari A, Bolondi L (2003)** In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair. *J Hepatol* 39:997-1003
89. **Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R (2005)** Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 8:147-156
90. **Grümmer R, Schwarzer F, Balczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E (2001)** Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod* 16:1736-1743
91. **Grümmer R (2006)** Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 12:641-649
92. **Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi (1994)** Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. *Hum Reprod* 9:1158-1162
93. **Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi (2001)** Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. *Hum Reprod* 16:2668-2671
94. **Guerreiro S, Monteiro R, Martins MJ, Calhau C, Azevedo I, Soares R (2007)** Distinct modulation of alkaline phosphatase isoenzymes by 17 $\beta$ -estradiol and xanthohumol in breast cancer MCF-7 cells. *Clin Biochem* 40:268-273
95. **Guo J, Nikolic D, Chadwick LR, Pauli GF, van Breemen RB (2006)** Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.). *Drug Metab Dispos* 34:1152-1159
96. **Guo SW (2009)** Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update* 15:441-461
97. **Halban J (1924)** Hysteroadenosis metaplastica. *Wien Klin Wochenschr* 37: 1205-1206
98. **Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R et al. (1990)** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162:285-294
99. **Halliwell B, Cross CE (1994)** Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10:5-12
100. **Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM (1984)** Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64:151-154

101. Harada T, Enatsu A, Mitsunari M, Nagano Y, Ito M, Tsudo T, Taniguchi F, Iwabe T, Tanikawa M, Terakawa N (1999) Role of cytokines in progression of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 47:34-39
102. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ahn KS, Anand P, Krishnan S, Guha S, Aggarwal BB (2009) Modification of the cysteine residues in IkappaBalpha kinase and NF-kappaB (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF-kappaB-regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells. *Blood* 113:2003-2013
103. Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Sethi G, Diagaradjane P, Anand P, Pandey MK, Gelovani J, Krishnan S, Guha S, Aggarwal BB (2010) Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 127:257-268
104. Healy DL, Rogers PA, Hii L, Wingfield M (1998) Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 4:736-740
105. Hemmings R, Rivard M, Olive DL, Poliquin-Fleury J, Gagné D, Hugo P, Gosselin D (2004) Evaluation of risk factors associated with endometriosis. *Fertil Steril* 81:1513-1521
106. Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, Morimoto C, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. (2005) Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Hum Reprod* 20:2092-2096
107. Holmes-McNary M, Baldwin AS Jr (2000) Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* 60:3477-3483
108. Honoré GM (1999) Extrapelvic endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 42:699-711
109. Hu Y, Sun CY, Huang J, Hong L, Zhang L, Chu ZB (2007) Antimyeloma effects of resveratrol through inhibition of angiogenesis. *Chin Med J (Engl)* 120:1672-1677
110. Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BD, Fan TP, Smith SK (2003) Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2889-2899
111. Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Phillips SC, Smith SK, Charnock-Jones DS (2005) Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 20:350-358
112. Hussong R, Frank N, Knauff J, Ittrich C, Owen R, Becker H, Gerhäuser C (2005) A safety study of oral xanthohumol administration and its influence on fertility in Sprague Dawley rats. *Mol Nutr Food Res* 49:861-867

113. Ichikawa T, Hayashi R, Suzuki K, Imanishi S, Kambara K, Okazawa S, Inomata M, Yamada T, Yamazaki Y, Koshimizu Y, Miwa T, Matsui S, Usui I, Urakaze M, Matsuya Y, Sasahara M, Tobe K (2013) Sirtuin 1 activator SRT1720 suppresses inflammation in an ovalbumin-induced mouse model of asthma. *Respirology* 18:332-339
114. Iwanoff NS (1898) Drüsiges cystenhaltiges Uterusfibromyom complicirt durch Sarcom und Carcinom. (Adenofibromyoma cysticum sarcomatodes carcinomatosum). *Monatsschr Geburtsh Gynäkol* 7:295-300
115. Jacobson TZ, Duffy JM, Barlow D, Koninckx PR, Garry R (2009) Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 7:CD001300
116. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220
117. Javert CT (1949) Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer* 2:399-410
118. Jenkins S, Olive DL, Haney AF (1986) Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution. *Obstet Gynecol* 67:335-338
119. Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB (2002) Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 8:893-903
120. Jouannot E, Duong-Van-Huyen JP, Bourahla K, Laugier P, Lelievre-Pegorier M, Bridal L (2006) High-frequency ultrasound detection and follow-up of Wilms' tumor in the mouse. *Ultrasound Med Biol* 32:183-190
121. Jung H, Kang S, Hyun S, Choi J (2005) In vitro free radical and ONOO- scavengers from *Sophora flavescens*. *Arch Pharm Res* 28:534-540
122. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E; ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group (2005) ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 20:2698-2704
123. Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Miura S, Sekine I, Ishimaru T (2006) Peritoneal fluid and serum levels of hepatocyte growth factor may predict the activity of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 85:458-466



124. **Knapp VJ (1999)** How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease. *Fertil Steril* 72:10-14
125. **Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH (1998)** Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 4:741-751
126. **Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S (1999)** Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecol Obstet Invest* 47 Suppl 1:3-9
127. **Kordek R, Biernat W, Alwasiak J, Liberski PP (1996)** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 immunopositivity in human astrocytic tumours. *Acta Neurochir* 138:509-512
128. **Kressin P, Wolber EM, Wodrich H, Meyhöfer-Malik A, Buchweitz O, Diedrich K, Malik E (2001)** Vascular endothelial growth factor mRNA in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil Steril* 76:1220-1224
129. **Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K (1998)** Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 4:719-723
130. **Kyama CM, Overbergh L, Debrock S, Valckx D, Vander Perre S, Meuleman C, Mihalyi A, Mwenda JM, Mathieu C, D'Hooghe TM (2006)** Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril* 85:1667-1675
131. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Menger MD (2005)** In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 84 Suppl 2:1199-1209
132. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD (2006a)** Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 21:262-268
133. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD (2006b)** Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 149:137-144
134. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD (2007)** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 87:163-171

135. **Laschke MW, Menger MD (2007)** In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 13:331-342
136. **Laschke MW, Schwender C, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD (2008)** Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo. *Hum Reprod* 23:2308-2318
137. **Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, Zollner TM, Menger MD (2010)** High-resolution ultrasound imaging: a novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol* 176:585-593
138. **Laschke MW, Vorsterman van Oijen AE, Scheuer C, Menger MD (2011)** In vitro and in vivo evaluation of the anti-angiogenic actions of 4-hydroxybenzyl alcohol. *Br J Pharmacol* 163:835-844
139. **Lauchlan SC (1972)** The secondary Müllerian system. *Obstet Gynecol Surv* 27:133-146
140. **Lee B, Lee EJ, Kim DI, Park SK, Kim WJ, Moon SK (2009)** Inhibition of proliferation and migration by piceatannol in vascular smooth muscle cells. *Toxicol In Vitro* 23:1284-1291
141. **Legette L, Ma L, Reed RL, Miranda CL, Christensen JM, Rodriguez-Proteau R, Stevens JF (2012)** Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration. *Mol Nutr Food Res* 56:466-474
142. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993)** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-1062
143. **Leyendecker G, Kunz G, Noe M, Herbertz M, Mall G (1998)** Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update* 4:752-762
144. **Leyendecker G, Herbertz M, Kunz G, Mall G (2002)** Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod* 17:2725-2736
145. **Leyendecker G, Wildt L, Mall G (2009)** The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet* 280:529-538
146. **Li ZG, Hong T, Shimada Y, Komoto I, Kawabe A, Ding Y, Kaganoi J, Hashimoto Y, Imamura M (2002)** Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol. *Carcinogenesis* 23:1531-1536

147. **Liang YC, Tsai SH, Chen L, Lin-Shiau SY, Lin JK (2003)** Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol* 65:1053-1060
148. **Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-Boudier HA, Evers JL (2001)** Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 16:627-631
149. **Malhotra N, Karmakar D, Tripathi V, Luthra K, Kumar S (2012)** Correlation of angiogenic cytokines-leptin and IL-8 in stage, type and presentation of endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 28:224-227
150. **Martin JD Jr, Hauck AE (1985)** Endometriosis in the male. *Am Surg* 51:426-430
151. **Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Yokomizo R, Noda T, Kimura Y, Okamura K (2001)** Erythropoietin concentrations are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 16:945-948
152. **Matsuzaki S, Maleysson E, Darcha C (2010)** Analysis of matrix metalloproteinase-7 expression in eutopic and ectopic endometrium samples from patients with different forms of endometriosis. *Hum Reprod* 25:742-750
153. **McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK (1996a)** Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 11:220-223
154. **McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Müller KH, Sharkey AM, Smith SK (1996b)** Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 98:482-489
155. **Merrill JA (1966)** Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *Am J Obstet Gynecol* 94:780-790
156. **Meyer R (1919)** Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zbl Gynäkol* 43:745-750
157. **Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR (1999)** Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 37:271-285

158. **Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ (2004)** Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am J Epidemiol* 160:784-796
159. **Monteghirfo S, Tosetti F, Ambrosini C, Stigliani S, Pozzi S, Frassoni F, Fassina G, Soverini S, Albini A, Ferrari N (2008)** Antileukemia effects of xanthohumol in Bcr/Abl-transformed cells involve nuclear factor-kappaB and p53 modulation. *Mol Cancer Ther* 7:2692-2702
160. **Monteiro R, Becker H, Azevedo I, Calhau C (2006)** Effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity. *J Agric Food Chem* 54:2938-2943
161. **Monteiro R, Calhau C, Silva AO, Pinheiro-Silva S, Guerreiro S, Gärtner F, Azevedo I, Soares R (2008)** Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts. *J Cell Biochem* 104:1699-1707
162. **Montgomery GW, Nyholt DR, Zhao ZZ, Treloar SA, Painter JN, Missmer SA, Kennedy SH, Zondervan KT (2008)** The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update* 14:447-457
163. **Mukherjee S, Dudley JI, Das DK (2010)** Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response* 8:478-500
164. **Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Maas JW, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL (2003)** Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 18:30-34
165. **Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, Bouma-Ter Steege JC, Thijssen VL, Evers JL, Groothuis PG (2004)** Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1089-1095
166. **Nap AW, Dunselman GA, Griffioen AW, Mayo KH, Evers JL, Groothuis PG (2005)** Angiostatic agents prevent the development of endometriosis-like lesions in the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril* 83:793-795
167. **Negrão R, Costa R, Duarte D, Gomes TT, Coelho P, Guimarães JT, Guardão L, Azevedo I, Soares R (2012)** Xanthohumol-supplemented beer modulates angiogenesis and inflammation in a skin wound healing model. Involvement of local adipocytes. *J Cell Biochem* 113:100-109
168. **Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F (2009)** Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol* 175:225-234
169. **Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J (1993)** Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 59:681-684

170. **Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J (2000a)** Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil Steril* 74:306-312
171. **Nisolle M, Casanas-Roux F, Marbaix E, Jadoul P, Donnez J (2000b)** Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. *Hum Reprod* 15:572-577
172. **Nothnick WB (2010)** Endometriosis: in search of optimal treatment. *Minerva Ginecol* 62:17-31
173. **Nothnick WB (2011)** The emerging use of aromatase inhibitors for endometriosis treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 9:87
174. **Novak E (1931)** Pelvic endometriosis. Spontaneous rupture of endometrial cysts, with a report of three cases. *Am J Obstet Gynecol* 22:826-837
175. **Nowak NM, Fischer OM, Gust TC, Fuhrmann U, Habenicht UF, Schmidt A. (2008)** Intraperitoneal inflammation decreases endometriosis in a mouse model. *Hum Reprod* 23:2466-2474
176. **Oktem M, Esinler I, Eroglu D, Haberal N, Bayraktar N, Zeyneloglu HB (2007)** High-dose atorvastatin causes regression of endometriotic implants: a rat model. *Hum Reprod* 22:1474-1480
177. **Oliker AJ, Harris AE (1971)** Endometriosis of the bladder in a male patient. *J Urol* 106:858-859
178. **Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Baraño RI, Meresman G (2011)** The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil Steril* 96:428-433
179. **Olive DL, Henderson DY (1987)** Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet Gynecol* 69:412-415
180. **Olive DL, Pritts EA (2001)** Treatment of endometriosis. *N Engl J Med* 345:266-275
181. **Olive DL (2003)** Medical therapy of endometriosis. *Semin Reprod Med* 21:209-222
182. **Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR (1991)** Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 56:45-51
183. **Pan L, Becker H, Gerhäuser C (2005)** Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Mol Nutr Food Res* 49:837-843
184. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA (1979)** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18:311-318

185. **Park JK1, Song M, Dominguez CE, Walter MF, Santanam N, Parthasarathy S, Murphy AA (2006)** Glycodelin mediates the increase in vascular endothelial growth factor in response to oxidative stress in the endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 195:1772-1777
186. **Peluso MR, Miranda CL, Hobbs DJ, Proteau RR, Stevens JF (2010)** Xanthohumol and related prenylated flavonoids inhibit inflammatory cytokine production in LPS-activated THP-1 monocytes: structure-activity relationships and in silico binding to myeloid differentiation protein-2 (MD-2). *Planta Med* 76:1536-1543
187. **Pinkert TC, Catlow CE, Straus R (1979)** Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer* 43:1562-1567
188. **Possemiers S, Bolca S, Grootaert C, Heyerick A, Decroos K, Dhooge W, De Keukeleire D, Rabot S, Verstraete W, Van de Wiele T (2006)** The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *J Nutr* 136:1862-1867
189. **Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2004)** Endometriosis and infertility. *Fertil Steril* 81:1441-1446
190. **Rawson JM (1991)** Prevalence of endometriosis in asymptomatic women. *J Reprod Med* 36:513-515
191. **Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008)** Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659-661
192. **Redwine DB (1987)** The distribution of endometriosis in the pelvis by age groups and fertility. *Fertil Steril* 47:173-175
193. **Renaud S, de Lorgeril M (1993)** The French paradox: dietary factors and cigarette smoking-related health risks. *Ann N Y Acad Sci* 28:299-309
194. **Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA (1992)** Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 6:886-892
195. **Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA (2002)** Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int J Exp Pathol* 83:151-163
196. **Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA, Meresman GF, Barañao RI (2011)** Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci* 18:614-622

197. **Rudzitis-Auth J, Körbel C, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW (2012)** Xanthohumol inhibits growth and vascularization of developing endometriotic lesions. *Hum Reprod* 27:1735-1744
198. **Rudzitis-Auth J, Menger MD, Laschke MW (2013)** Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in experimental endometriosis. *Hum Reprod* 28:1339-1347
199. **Russel WW (1899)** Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: ovariancysts of müllerian origin. *Bull John Hopkins Hospital* 10:8-10
200. **Sacco K, Portelli M, Pollacco J, Schembri-Wismayer P, Calleja-Agius J (2012)** The role of prostaglandin E2 in endometriosis. *Gynecol Endocrinol* 28:134-138
201. **Sampson JA (1927)** Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14:422-429
202. **Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Villegas I, Talero E, de la Lastra CA (2010)** Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 633:78-84
203. **Sandison JC (1928)** The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behaviour of living cells and tissues seen with the microscope. *Am J Anat* 41:447-472
204. **Sanfilippo JS, Wakim NG, Schikler KN, Yussman MA (1986)** Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 154:39-43
205. **Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN 3rd (1995)** Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstet Gynecol* 85:983-992
206. **Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D (2008)** NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *Int Rev Immunol* 27:293-319
207. **Schenken RS, Asch RH (1980)** Surgical induction of endometriosis in the rabbit: effects on fertility and concentrations of peritoneal fluid prostaglandins. *Fertil Steril* 34:581-587
208. **Scott E, Steward WP, Gescher AJ, Brown K. (2012)** Resveratrol in human cancer chemoprevention--choosing the 'right' dose. *Mol Nutr Food Res* 56:7-13
209. **Shah DK, Correia KF, Vitonis AF, Missmer SA (2013)** Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. *Hum Reprod* 28:1783-1792
210. **Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN (1996)** Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium:

- implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3112-3118
211. **Signorelli P, Ghidoni R (2005)** Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 16:449-466
212. **Silveira CG, Finas D, Hunold P, Köster F, Stroschein K, Canny GO, Moldenhauer G, Altevogt P, Rody A, Hornung D (2013)** L1 cell adhesion molecule as a potential therapeutic target in murine models of endometriosis using a monoclonal antibody approach. *PLoS One* 8:e82512
213. **Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, Brodsky V, Canis M, Colombo GL, DeLeire T, Falcone T, Graham B, Halis G, Horne A, Kanj O, Kjer JJ, Kristensen J, Lebovic D, Mueller M, Vigano P, Wulschleger M, D'Hooghe T (2012)** The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum Reprod* 27:1292-1299
214. **Simpson JL, Bischoff FZ, Kamat A, Buster JE, Carson SA (2003)** Genetics of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 30:21-40
215. **Singh NP, Singh UP, Hegde VL, Guan H, Hofseth L, Nagarkatti M, Nagarkatti PS (2011)** Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) suppresses EL4 tumor growth by induction of apoptosis involving reciprocal regulation of SIRT1 and NF- $\kappa$ B. *Mol Nutr Food Res* 55:1207-1218
216. **Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA (2011)** Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 55:1129-1141
217. **Somigliana E, Viganò P, Rossi G, Carinelli S, Vignali M, Panina-Bordignon P (1999)** Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis. *Hum Reprod* 14:2944-2950
218. **Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ (1984)** Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 6:33-36
219. **Steinleitner A, Lambert H, Suarez M, Serpa N, Roy S (1991)** Immunomodulation in the treatment of endometriosis-associated subfertility: use of pentoxifylline to reverse the inhibition of fertilization by surgically induced endometriosis in a rodent model. *Fertil Steril* 56:975-979
220. **Stevens JF, Ivancic M, Hsu VL, Deinzer ML (1997)** Prenylflavonoids from *Humulus Lupulus*. *Phytochemistry* 44:1575-1585
221. **Stevens JF, Miranda CL, Buhler DR, Deinzer ML (1998)** Chemistry and biology of hop flavonoids. *J Am Soc Brew Chem* 56: 136-145



222. **Stevens JF, Taylor AW, Deinzer ML (1999)** Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 832:97-107
223. **Stevens JF, Page JE (2004)** Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 65:1317-1330
224. **Stoeckemann K, Hegele-Hartung C, Chwalisz K (1995)** Effects of the progesterone antagonists onapristone (ZK 98 299) and ZK 136 799 on surgically induced endometriosis in intact rats. *Hum Reprod* 10:3264-3271
225. **Story L, Kennedy S (2004)** Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J* 45:132-138
226. **Strathmann J, Klimo K, Sauer SW, Okun JG, Prehn JH, Gerhäuser C (2010)** Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis via a mitochondria-mediated mechanism. *FASEB J* 24:2938-2950
227. **Surrey ES, Halme J (1991)** Effect of platelet-derived growth factor on endometrial stromal cell proliferation in vitro: a model for endometriosis? *Fertil Steril* 56:672-679
228. **Surrey ES, Halme J (1992)** Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol, and leuprolide acetate on endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Fertil Steril* 58:273-278
229. **Suzumori N, Zhao XX, Suzumori K (2004)** Elevated angiogenin levels in the peritoneal fluid of women with endometriosis correlate with the extent of the disorder. *Fertil Steril* 82:93-96
230. **Taylor RN, Yu J, Torres PB, Schickedanz AC, Park JK, Mueller MD, Sidell N (2009)** Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sci* 16:140-146
231. **The american society for reproductive medicine (1997)** The Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 67:817-821
232. **Tseng SH, Lin SM, Chen JC, Su YH, Huang HY, Chen CK, Lin PY, Chen Y (2004)** Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin Cancer Res* 10:2190-2202
233. **Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Donnez J (2002)** Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 77:861-870
234. **Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Eggermont J, Donnez J (2004)** Characterization of iron deposition in endometriotic lesions induced in the nude mouse model. *Hum Reprod* 19:1265-1271

235. **Venè R, Benelli R, Minghelli S, Astigiano S, Tosetti F, Ferrari N (2012)** Xanthohumol impairs human prostate cancer cell growth and invasion and diminishes the incidence and progression of advanced tumors in TRAMP mice. *Mol Med* 18:1292-1302
236. **Vercellini P, Frontino G, De Giorgi O, Aimi G, Zaina B, Crosignani PG (2003)** Comparison of a levonorgestrel-releasing intrauterine device versus expectant management after conservative surgery for symptomatic endometriosis: a pilot study. *Fertil Steril* 80:305-309
237. **Vernon MW, Wilson EA (1985)** Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 44:684-694
238. **Vlahos NF, Gregoriou O, Deliveliotou A, Perrea D, Vlachos A, Zhao Y, Lai J, Creatsas G (2010)** Effect of pentoxifylline on vascular endothelial growth factor C and flk-1 expression on endometrial implants in the rat endometriosis model. *Fertil Steril* 93:1316-1323
239. **Von Recklinghausen, F (1896)** "Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: Their origin as remnants of the wolffian body." *Wien Klin Wochenschr* 8:530
240. **Von Rokitsansky C (1860)** Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus- und Ovarial-Sarcomen. *Ztschr KK Gesellsch Ärzte Wien* 37:577-581
241. **Walle T (2011)** Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215:9-15
242. **Wang CC, Xu H, Man GC, Zhang T, Chu KO, Chu CY, Cheng JT, Li G, He YX, Qin L, Lau TS, Kwong J, Chan TH (2013)** Prodrug of green tea epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) as a potent anti-angiogenesis agent for endometriosis in mice. *Angiogenesis* 16:59-69
243. **Wang D, Liu Y, Han J, Zai D, Ji M, Cheng W, Xu L, Yang L, He M, Ni J, Cai Z, Yu C (2011)** Puerarin suppresses invasion and vascularization of endometriosis tissue stimulated by 17 $\beta$ -estradiol. *PLoS One* 6:e25011
244. **Wang Y, Chen Y, Wang J, Chen J, Aggarwal BB, Pang X, Liu M (2012)** Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, suppresses cancer cell invasion through inhibiting the expression of CXCR4 chemokine receptor. *Curr Mol Med* 12:153-162
245. **Weissleder R (2002)** Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 2:11-18
246. **Wieser F, Cohen M, Gaeddert A, Yu J, Burks-Wicks C, Berga SL, Taylor RN (2007)** Evolution of medical treatment for endometriosis: back to the roots? *Hum Reprod Update* 13:487-499
247. **Wirtzfeld LA, Wu G, Bygrave M, Yamasaki Y, Sakai H, Moussa M, Izawa JI, Downey DB, Greenberg NM, Fenster A, Xuan JW, Lacefield JC (2005)** A new three-dimensional ultrasound

- microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer mouse model. *Cancer Res* 65:6337-6345
248. **Wolber EM, Kressin P, Meyhöfer-Malik A, Diedrich K, Malik E (2003)** Differential induction of matrix metalloproteinase 1 and 2 in ectopic endometrium. *Reprod Biomed Online* 6:238-243
249. **Wunderlich S, Zürcher A, Back W (2005)** Enrichment of xanthohumol in the brewing process *Mol Nutr Food Res* 49:874-881
250. **Xu H, Lui WT, Chu CY, Ng PS, Wang CC, Rogers MS (2009)** Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. *Hum Reprod* 24:608-618
251. **Xu Z, Zhao F, Lin F, Chen J, Huang Y (2012)** Lipoxin A4 inhibits the development of endometriosis in mice: the role of anti-inflammation and anti-angiogenesis. *Am J Reprod Immunol* 67:491-497
252. **Yavuz E, Oktem M, Esinler I, Toru SA, Zeyneloglu HB (2007)** Genistein causes regression of endometriotic implants in the rat model. *Fertil Steril* 88:1129-1134
253. **Yu CC, Woods AL, Levison DA (1992)** The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *Histochem J* 24:121-131
254. **Yu HB, Zhang HF, Zhang X, Li DY, Xue HZ, Pan CE, Zhao SH (2010)** Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism. *Hepatogastroenterology* 57:1241-1246
255. **Zhang H, Zhao X, Liu S, Li J, Wen Z, Li M (2010)** 17betaE2 promotes cell proliferation in endometriosis by decreasing PTEN via NFkappaB-dependent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 317:31-43
256. **Zhang Q, Tang X, Lu QY, Zhang ZF, Brown J, Le AD (2005)** Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 4:1465-1474
257. **Zhang W, Wang X, Chen T (2011)** Resveratrol induces mitochondria-mediated AIF and to a lesser extent caspase-9-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma ASTC-a-1 cells. *Mol Cell Biochem* 354:29-37
258. **Zhang Y, Cao H, Hu YY, Wang H, Zhang CJ (2011)** Inhibitory effect of curcumin on angiogenesis in ectopic endometrium of rats with experimental endometriosis. *Int J Mol Med* 27:87-94
259. **Zhou WD, Yang HM, Wang Q, Su DY, Liu FA, Zhao M, Chen QH, Chen QX (2010)** SB203580, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, suppresses the development of endometriosis

by down-regulating proinflammatory cytokines and proteolytic factors in a mouse model. *Hum Reprod* 25:3110-3116

## 9. Publikationen

### 9.1. Originalarbeiten

Zeilinger K, Sauer IM, Pless G, Strobel C, **Rudзитis J**, Wang A, Nüssler AK, Grebe A, Mao L, Auth SH, Unger J, Neuhaus P, Gerlach JC (2002) Three-dimensional co-culture of primary human liver cells in bioreactors for in vitro drug studies: effects of the initial cell quality on the long-term maintenance of hepatocyte-specific functions. *Altern Lab Anim* 30:525-538

Laschke MW, Körbel C, **Rudзитis-Auth J**, Menger MD (2010) High-resolution ultrasound imaging technology: A novel method for the non-invasive in vivo analysis of endometriotic lesions in small animal models. *Am J Pathol* 176:585-593

Feng D, Welker S, Körbel C, **Rudзитis-Auth J**, Menger MD, Montenarh M, Laschke MW (2012) Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions. *Angiogenesis* 15:243-252

**Rudзитis-Auth J**, Körbel C, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW (2012) Xanthohumol inhibits growth and vascularization of developing endometriotic lesions. *Hum Reprod* 27:1735-1744

**Rudзитis-Auth J**, Menger MD, Laschke MW (2013) Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 28:1339-1347

Laschke MW, **Rudзитis-Auth J**, Menger MD (2013) Regional treatment with liquid barrier agents: a novel therapeutic option for intraperitoneal endometriosis? *Med Hypotheses* 80:709-710

Dahmke IN, Backes C, **Rudзитis-Auth J**, Laschke MW, Leidinger P, Menger MD, Meese E, Mahlknecht U (2013). Curcumin intake affects miRNA signature in murine melanoma with mmu-miR-205-5p most significantly altered. *PLoS One* 8:e81122

### 9.2. Kongressbeiträge

**Rudзитis-Auth J**, Menger MD, Laschke MW. Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in endometriotic lesions. 2<sup>ND</sup> *European Congress on Endometriosis*, Berlin 2013

### 9.3. Auszeichnungen

- Forschungspreis 2012 der Freunde des Universitätsklinikums des Saarlandes e.V.

*Titel: Traubensaft – Das Elixier gegen Endometriose: Analyse der anti-angiogenen Wirkung von Resveratrol auf die Entwicklung neuer Blutgefäße in Endometrioseherden*

- Cover page, Human Reproduction Vol. 27 (6), 2012



*Immunohistochemische Fluoreszenzfärbung proliferierender Endothelzellen in Endometrioseherden unter der Behandlung mit Xanthohumol.*

Erschienen im Rahmen der Publikation:

**Rudзитis-Auth J**, Menger MD, Laschke MW (2013) Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 28:1339-1347

## 10. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk eines einzelnen. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich unterstützt und begleitet haben.

Vielen Dank an:

Prof. Dr. Michael Menger für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes.

PD Dr. Matthias Laschke für die stetige Unterstützung und Motivation in allen Phasen der Arbeit.

Dr. Christina Körbel für die Einführung in die Ultraschall-Analyse.

Dr. Claudia Scheuer und Julia Parakenings für ihre Unterstützung bei den Western Blot-Analysen.

Sandra Schuler und Janine Becker für ihre Hilfe bei den immunhistochemischen Analysen.

Elisabeth Gluding und allen Tierpflegerinnen.

Meine Familie und Freunde.